

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke  
Schwerpunkt Endokrinologische Forschung  
Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

## **Die Funktion des ACTH-Rezeptors in Adipozyten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Nilay Hatiboglu  
geboren in Marktredwitz

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. Daniel Teupser  
Prof. Dr. med. Klaus Wenke

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Slawik

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2013

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen wundervollen Freunden  
Leila, Steffi und Christoph.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Hinführung zur Thematik.....	1
1.1.1	<i>Adipositas in der Gesellschaft und Folgen für die Medizin .....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Fettgewebe.....</i>	<i>1</i>
1.1.3	<i>Insulinresistenz und Lipotoxizität.....</i>	<i>3</i>
1.1.4	<i>Entwicklung von Adipozyten.....</i>	<i>4</i>
1.1.5	<i>Melanokortinsystem und ACTH-Rezeptor.....</i>	<i>5</i>
1.2	Fragestellung: Die Bedeutung des ACTH-Rezeptors für Differenzierung und Fettsäurestoffwechsel von Adipozyten .....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1	Zellkultur.....	9
2.2	Gewebeproben .....	12
2.3	RNA-Extraktion .....	14
2.4	Reverse Transkription .....	16
2.5	Quantitative Real-Time PCR.....	17
2.6	Oil-Red-O Färbung .....	20
2.7	Lipolyseassay .....	21
2.8	Gaschromatographie .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
3.1	Effektivität des Mc2-R kd.....	27
3.2	Mc2-R kd hat eingeschränkte Lipidakkumulation zur Folge .....	27
3.3	Mc2-R kd führt zu funktionellen Einschränkungen differenzierter 3T3-L1 Zellen .....	32
3.4	Mc2-R kd verändert die Fettsäurezusammensetzung qualitativ und quantitativ .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>59</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hinführung zur Thematik

### 1.1.1 *Adipositas in der Gesellschaft und Folgen für die Medizin*

Übergewicht und Adipositas stellen international ein zunehmendes Problem dar, wobei Prävalenz und Inzidenz in den vergangenen Jahrzehnten vor allem in der westlichen Wohlstandsgesellschaft stetig gestiegen sind. Die Weltgesundheitsorganisation WHO sieht sich in ihrer Gesundheitspolitik mit schwerwiegenden Herausforderungen konfrontiert: Adipositas und assoziierte Erkrankungen erfordern bis zu 6 % der nationalen Gesundheitsausgaben; die Mortalität steigt bei Personen mit einem *Body Mass Index* (BMI)  $> 30 \text{ kg/ m}^2$  gegenüber Normalgewichtigen bereits deutlich an (1). Auch Deutschland gehört bezüglich dieser Problematik zu den führenden Nationen in Europa. Laut der Nationalen Verzehrsstudie II der Deutschen Adipositas Gesellschaft von 2008 gelten ca. 37,4 % der Erwachsenen in Deutschland als übergewichtig (BMI  $> 25 - 29,9 \text{ kg/ m}^2$ ), weitere 20,8 % als adipös (BMI  $> 30 \text{ kg/ m}^2$ ) (2). Neben evidenten Folgen wie der Einschränkung der Lebensqualität durch geringe Mobilität und psychosoziale Belastung sowie mechanische Überbeanspruchung von Gelenken sind dabei vor allem die weniger offensichtlichen Folgeerkrankungen langfristig oft lebensbedrohlich. So geht Adipositas mit einer Reihe von metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen wie Insulinresistenz und daraus folgender gestörter Glukosetoleranz bzw. Diabetes Mellitus Typ 2, Dyslipoproteinämie, arterieller Hypertonie, Arteriosklerose und Gicht (in Kombination als metabolisches Syndrom bezeichnet) einher (3). Auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten zahlreicher solider Tumore (Mamma-, Ovarial-, Kolon-, Pankreas- und Ösophaguskarzinome) wird durch Adipositas erhöht (4).

Um der wachsenden Morbidität und Mortalität mit neuen Therapieansätzen zu begegnen, ist die Erforschung pathophysiologischer Grundlagen der Ursachen und Folgeerkrankungen Gegenstand intensiver Forschung. Im Zentrum steht dabei das Fettgewebe, das eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der Adipositas sowie der Energiehomöostase und deren Dysregulation einnimmt (3, 5).

### 1.1.2 *Fettgewebe*

Fettgewebe kann nach morphologischen und funktionellen Kriterien in braunes (*Brown Adipose Tissue* (BAT)) und weißes (*White Adipose Tissue* (WAT)) Fettgewebe unterteilt werden. Neben der Koloration unterscheiden sich diese beiden Formen aufgrund von Lokalisation, Aufbau und Auftrittszeitpunkt; all dem liegen funktionelle Unterschiede zugrunde.

Das klassische multivakuoläre braune Fettgewebe findet sich lediglich bei Säugetieren und Neugeborenen, ist für diese jedoch zur Erhaltung der Körpertemperatur lebenswichtig. Es stellt eine schnell rekrutierbare Quelle zur Wärmeproduktion dar. Dies geschieht durch direkte Einspeisung von Energie aus dem Fettsäureabbau in die Thermogenese durch das mitochondriale *Uncoupling Protein 1*, das den oxidativen Metabolismus von der Adenosintriphosphatsynthese entkoppelt (6). Beim Erwachsenen ist kein klassisches BAT an der typischen interskapulären Lokalisation nachweisbar; es wurde angenommen, dass es für die Thermogenese braunen Fettgewebes wegen der Möglichkeit der Wärmeerzeugung durch Muskelzittern unwichtig geworden und weitgehend zurückgebildet sei (7). Neuere Untersuchungen mittels Positronen-Emissions- und Computertomographie belegen jedoch paraaortal gelegene stoffwechselaktive braune Adipozyten; bemerkenswert ist hierbei die inverse Korrelation von Körpergewicht und Menge des BAT (8).

Das univakuoläre weiße Fettgewebe findet sich nahezu überall im Körper und hat als wesentliche Funktionen mechanischen Schutz, Isolation, Energiespeicherung und Hormonproduktion zur Steuerung der Energiehomöostase. Fettzellen ermöglichen dem Körper in Zeiten positiver Energiebilanz – etwa aufgrund von Bewegungsmangel oder übermäßiger Nahrungszufuhr – freie Fettsäuren aus dem Blut aufzunehmen und aus diesen zur höchsteffizienten Speicherung Triacylglyceride zu synthetisieren. Bei Nahrungsmangel oder erhöhtem Energiebedarf dagegen können freie Fettsäuren rasch durch Lipolyse mobilisiert und dem Körper zur Energiegewinnung zur Verfügung gestellt werden. Dieses dynamische, hormonell regulierte Gleichgewicht zwischen Lipogenese und Lipolyse sichert dem gesunden Körper ein stetig verfügbares Energiereservoir (9). Die pathophysiologische Relevanz der Lipolyse wurde kürzlich auch mittels *Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) knockout* Mäusen gezeigt; die genetische Veränderung führte zu niedrigeren Serumkonzentrationen an freien Fettsäuren, Organverfettung sowie einer Verbesserung der Insulinempfindlichkeit (10).

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass Adipozyten und Fettgewebe nicht nur ein passives Energiedepot des Körpers, sondern vielmehr ein vollwertiges endokrines Organ darstellen. Bereits 1994 wurde dem vom Fettgewebe sezernierten Peptid Leptin eine wesentliche Rolle in der Regulierung des Körpergewichts vermittelt durch die hypothalamisch-hypophysäre Achse zugesprochen (11). Daneben setzt das Fettgewebe noch eine Reihe von Mediatoren frei, denen eine auto- und parakrine Wirkung zukommen, vornehmlich Adipozytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-6. Fehlregulationen innerhalb dieser Kaskaden beeinflussen die Pathogenese der Adipositas und ihrer Komplikationen wie arterielle Hypertonie, thrombotische Ereignisse und Insulinresistenz (12, 13).

---

### 1.1.3 Insulinresistenz und Lipotoxizität

Insulin ist essentiell für die Regulation des Blutzuckerspiegels. Es ist als einziges Hormon in der Lage, diesen zu senken. Insulin wird von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas synthetisiert und oszillierend alle drei bis sechs Minuten ausgeschüttet. Neben dieser basalen Sekretion ist vor allem die pulsatile, postprandiale Sekretion als Reaktion auf Hyperglykämie von Bedeutung. Insulin vermittelt eine rasche Senkung des Blutzuckerspiegels durch die Förderung der Glukoseaufnahme in insulinsensitiven Geweben wie Skelettmuskulatur, Hepatozyten und Adipozyten. Dies wird durch Insulinrezeptoren an den peripheren Zielorganen gewährleistet, die eine Translokation des *Glucose Transporter Type 4* an die Zelloberfläche vermitteln.

Bei genetischer Disposition lässt sich einerseits ein Postrezeptordefekt als Störung des intrazellulären Stoffwechsels nachweisen, andererseits nimmt mit steigendem Übergewicht die Anzahl und Empfindlichkeit der Insulinrezeptoren ab. Diese „*Down-regulation*“ bedingt eine periphere Insulinresistenz und den relativen Insulinmangel bei Adipositas, die zu erhöhtem Insulinbedarf mit gesteigerter und auch verzögerter basaler und stimulierter Insulinsekretion führen. Dies wiederum hat eine Überstimulation der  $\beta$ -Zellen sowie eine Hyperplasie der Langerhans-Inseln zur Folge. Nach deren weitgehender Erschöpfung kommt es durch den absoluten Insulinmangel zum manifesten Diabetes mellitus Typ 2 (14). Die Insulinsensitivität von Fettzellen kann daher auch als früher Marker des metabolischen Syndroms betrachtet werden (15).

Fettgewebe wurde lange Zeit als inaktives, passiv expandierendes Speicherorgan mit einer festen Anzahl an Adipozyten betrachtet, die sich den zur Verfügung gestellten Mengen an Nährstoffen gänzlich anpassen würden. In den letzten Jahren wurde allerdings immer deutlicher, dass Fettzellen nur eine begrenzte Kapazität besitzen. Die Vermehrung der vorhandenen Fettgewebemenge stellt einen aktiven Prozess aus Hypertrophie und Hyperplasie mit Ausbildung neuer Präadipozyten und deren Entwicklung zu reifen Adipozyten dar (3, 9, 16). Wird der Körper mit Nährstoffen überladen und überschreitet diese Menge die natürliche Speicherkapazität der Fettzellen, kommt es zur Hyperlipidämie und Ablagerung von Fettsäuren an unphysiologischen Stellen des Körpers wie beispielsweise an Herz, Nieren und anderen inneren Organen. Dieser Vorgang wird als ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese von Insulinresistenz, Diabetes Mellitus Typ 2, Leberverfettung und Herzinsuffizienz angesehen und „Lipotoxizität“ genannt (3, 17-19). Auch die Fettsäurezusammensetzung scheint einen Einfluss auf diesen Prozess zu haben; offensichtlich kommt etwa Palmitoleat (C16:1n-7) hierbei eine Schlüsselrolle zu (20, 21). Diese ungesättigte Fettsäure wurde neben Leptin und anderen



Adipozytokinen ebenfalls als ein vom Fettgewebe sezerniertes Hormon identifiziert, das bei der Regulation des metabolischen Gleichgewichts von Bedeutung ist. Im Mausmodell waren hohe Serumspiegel an Palmitoleat mit einer verbesserten Insulinsensitivität von Muskelzellen und einer verminderten Leberverfettung assoziiert (20).

Daneben führt die adipositasbedingte Hyperinsulinämie, die mit relativem Körpergewicht, Fettzellgröße und Fettmasse des Organismus korreliert, zur Zunahme der *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) - Triglyceride sowie zur Verminderung der *High Density Lipoprotein* (HDL) - Triglyceride. Diese Dyslipoproteinämie trägt ebenfalls zur Lipotoxizität bei.

#### 1.1.4 Entwicklung von Adipozyten

Die Differenzierung von Adipozyten und ihre biologischen Eigenschaften wurden in den letzten Jahrzehnten anhand von *in vitro* Modellen intensiv erforscht. Ihre metabolischen und endokrinen Aktivitäten unterliegen strengen Regulationen durch eine Kaskade spezifischer molekularer und zellulärer Faktoren, die immer exakter beschrieben werden.

Präadipozyten entstammen multipotenten mesenchymalen Vorläuferzellen, die ihrerseits aus pluripotenten Stammzellen hervorgehen. Der frühe Präadipozyt ist noch zu Wachstum und Vermehrung befähigt, muss sich aber diesen Zellzyklen entziehen, um zum adulten Adipozyten reifen zu können. Während ihrer Entwicklung vom undifferenzierten Präadipozyten zum differenzierten Adipozyten durchlaufen die Zellen drastische morphologische und molekulare Veränderungen (22).

Wachstum, klonale Vermehrung und Differenzierung der Präadipozyten werden durch Kommunikation der Zellen untereinander sowie der Zellen mit ihrer Umgebung kontrolliert und beeinflusst. Durch Konfluenz in *in vitro* Experimenten und vermittelt durch Zell-Zell-Kontakt kommt es durch Kontaktinhibition zum Wachstumsstillstand und die Differenzierung wird eingeleitet. Die Konfluenz ist allerdings nicht notwendig für diesen Vorgang, das Wachstum kann auch spontan sistieren. An den folgenden Vorgängen sind die beiden Transkriptionsfaktoren *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) und *CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$*  (C/EBP  $\alpha$ ) maßgeblich beteiligt (23).

Während ihrer Entwicklung durchlaufen die Zellen eine mikroskopisch verfolgbare morphologische Wandlung: Die fibroblasten-ähnlichen Präadipozyten verlieren ihre spindelförmigen Ausläufer, kugeln sich ab und beginnen, Fetttropfen zu akkumulieren. Im darauffolgenden Stadium des Lipoblasten weisen sie mehrere Fetttropfen im Zytoplasma auf, die im weiteren Verlauf konfluieren. Spontan verläuft dieser Prozess in zellkulturen Experimenten in *Newborn Calf Serum* (NCS) über einen Zeitraum von einigen Wochen, er kann

aber durch Zugabe eines „Differenzierungscocktails“ mit den Zusatzstoffen Dexamethason, Isobuthylmethylxanthine und Insulin anschaulich beschleunigt werden (22).

Diese morphologischen Veränderungen sind bedingt durch Änderungen der Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix sowie des Zytoskeletts (22). Die über eine Plasminogenkaskade vermittelte proteolytischen Degradation der Extrazellulären Matrix ist erforderlich für Zellformveränderung, Lipidakkumulation und Änderung des molekularen Expressionsprofils (24). Das Expressionsprofil ändert sich während der Differenzierung maßgeblich, vorwiegend auf transkriptionaler Ebene (22). Verschiedene Forschungsgruppen versuchten bereits, eine Hierarchie der über 2000 beteiligten Gene sowie eine nachvollziehbare chronologische Abfolge der molekularen Veränderungen zu erfassen (25). Auch wenn dies nicht uneingeschränkt möglich ist, sind doch einige Gene bereits gut untersucht. Ein Anstieg bzw. Abfall dieser Markergene ermöglicht es, die Entwicklung der Zellen auf molekularer Ebene zu verfolgen; die Einteilung erfolgt dabei dem Auftreten nach in frühe, mittelfristige und späte. Zu den sehr gut beschriebenen Markern gehören etwa C/EBP $\alpha$  und  $\beta$ , PPAR $\gamma$  und *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c* (SREBP-1c) (26), desweiteren *cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) *Responsive Element Binding Protein* (CREB), *Lipoprotein Lipase* (LPL) und *Preadipocyte Factor 1* (Pref-1) (27, 28).

Neben diesen besser untersuchten und charakterisierten Änderungen der Expressionsprofile ist die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieser molekularen Veränderungen in den Fokus der Forschung gerückt. Die Kommunikation zwischen Adipozyten und anderen zellulären Kompartimenten und Organsystemen spielt hierbei eine wichtige Rolle. Ein Beispiel ist die Interaktion des Melanokortinsystems und dem Fettgewebe.

#### 1.1.5 Melanokortinsystem und ACTH-Rezeptor

Das Melanokortinsystem besteht aus fünf Melanokortinrezeptoren, den antagonistisch wirksamen *Agouti-Protein* und *Agouti-related Protein*, sowie den agonistisch wirksamen Melanokortinpeptiden ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - *Melanocyte-Stimulating Hormone* (MSH) und *adrenocorticotropes Hormon* (ACTH)), die durch posttranslationale Abspaltung durch die Enzyme *Prohormone-Convertase 1* und *2* aus *Proopiomelanocortin* entstehen (29). Die bisher identifizierten Melanokortinrezeptor-Subtypen, die alle zur Familie der G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen gehören, zeigen eine gewebsspezifische Expression und kommen entsprechend unterschiedlichen Aufgaben nach (29).

Der Melanokortin-1-Rezeptor findet sich hauptsächlich in Melanozyten der Haut, Makrophagen sowie in malignen Melanomzellen und beeinflusst die Pigmentierung von Haut und Haaren. Der Melanokortin-3-Rezeptor findet sich vorwiegend im Gehirn. Dort konzentriert

sich sein Vorkommen auf bestimmte Kerngebiete des Hypothalamus. Daneben kommt er auch multilokal im Bereich des Gastrointestinaltrakts sowie in der Plazenta vor. Dem Mc3-R scheint ebenfalls eine Rolle im komplizierten Zusammenspiel der Gewichtsregulation zuzukommen. Der Melanokortin-4-Rezeptor zeigt sich im Gehirn weiter verteilt und wurde vor allem in Hypothalamus, Thalamus, Cortex und Hirnstamm identifiziert. Man geht von einer Interaktion zwischen Melanokortin-3-Rezeptor und Melanokortin-4-Rezeptor im Sinne einer Rezeptor-Dimerisierung aus. Der Melanokortin-5-Rezeptor wird ubiquitär exprimiert. Seine Rolle ist bisher weitgehend ungeklärt. Ein Funktionsverlust dieses Rezeptors scheint zu Insuffizienzen in den exokrinen Drüsensystemen zu führen (29).

Dem Melanokortin-2-Rezeptor (Mc2-R) kommt unter den fünf Subtypen eine Sonderrolle zu, da die Aktivierung nahezu ausschließlich durch ACTH erfolgt,  $\alpha$ -MSH hier aber nur sehr geringe Effekte erzielt (30). Er wird daher auch als ACTH-Rezeptor bezeichnet. Er kommt nicht ubiquitär vor, vielmehr findet er sich lediglich in Organen, die in der Energiehomöostase eine Rolle spielen: in den drei Schichten der Nebennierenrinde, den Inselzellen des Pankreas sowie in Adipozyten. Bemerkenswert ist dabei der signifikante Anstieg seiner Expression während der Differenzierung vom Präadipozyten zu Adipozyten (31). Anhand von funktionellen *in vitro* Untersuchungen und Promoteranalysen ist dieser Prozess neuerdings besser verstanden; unter anderem ist er durch eine Aktivierung des Promoters mittels *PPAR Response Element* und C/EBP vermittelt (32, 33).

Das Melanokortinsystem hat eine maßgebliche Bedeutung in der Regulation von Fettzellstoffwechsel und Energiehomöostase und ist ein wesentlicher Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis* (HPA)), das auch als „Stressachse“ bezeichnet wird (34). Das übergeordnete Organ dieser Achse ist der Hypothalamus, der auf physischen und psychischen Stress mit vermehrter Freisetzung von *Corticotropin-Releasing Hormone* reagiert. Dieses Hormon wiederum stimuliert die Hypophyse zur vermehrten Freisetzung von ACTH wodurch sie mit peripheren Organen kommuniziert. So übermittelt ACTH die hypothalamisch-hypophysäre Aktivität auf die Nebennierenrinde und reguliert damit die Kortisolproduktion des Körpers. Kortisol reduziert einerseits durch einen negativen Feedbackmechanismus auf die HPA-Achse die ACTH-Ausschüttung, während es andererseits metabolische Effekte induziert, etwa den Blutzuckerspiegel, unter anderem durch Förderung der lipolytischen Wirkung der Katecholamine, erhöht. Darüber hinaus sind Dysregulationen innerhalb dieser „Stressachse“ mit Adipositas und Insulinresistenz assoziiert (34).

Bisher wurde diese Funktion des ACTH als die einzig physiologisch relevante angesehen. Die Entdeckung und Erforschung des Mc2-R auf Adipozyten lässt nun aber auch eine weitere Rolle

---

von ACTH in der Lipidhomöostase und der Physiologie des Fettgewebes erahnen. So wurde die mögliche Existenz einer funktionellen Hypothalamus-Hypophysen-Adipozyten Achse in der Energiehomöostase mit zentralen Feedbackmechanismen durch freie Fettsäuren postuliert und ist Gegenstand intensiver Forschung.

Bekannt ist bisher, dass der Mc2-R auf Adipozyten nahezu ausschließlich durch ACTH aktiviert wird (30), wodurch in reifen Adipozyten die Lipolyse induziert wird; dies wurde *in vitro* und *ex vivo* belegt. In der Folge werden die lipolytischen Enzyme *Hormone Sensitive Lipase* (HSL) und ATGL aktiviert (35). Dies führt zu einem substantiellen Anstieg der Lipolyserate sowie zu einer Verminderung der Leptinproduktion und -sekretion; *in vitro* Experimente haben eine dosisabhängige Hemmung der Leptinsekretion durch physiologische ACTH Dosen um 30 % belegt (36, 37). Andererseits existiert aber auch eine Rückkopplung über Leptin auf die Hypothalamus-Hypophysenfunktion: eine Verminderung der Leptinsekretion enthemmt die Achse wodurch die ACTH-Sekretion verstärkt wird. Dieser Zusammenhang war für die anderen Spaltprodukte des *Proopiomelanocortin* nicht nachweisbar (36). Die negative Korrelation zwischen ACTH und Leptin konnte auch bereits *in vivo* gezeigt werden (38).

Die qualitative und quantitative Bedeutung der ACTH-vermittelten Lipolyse im direkten Vergleich zur Noradrenalin vermittelten Lipolyse ist unbekannt und die genauen molekularen Regulationsmechanismen zur Freisetzung von freien Fettsäuren aus Fettdepots noch wenig verstanden (39). Die bisherigen Beobachtungen machen eine Relevanz des Mc2-R auf Adipozyten für die Lipidhomöostase sowie einen bedeutenden Einfluss des Fettgewebes und der von ihm freigesetzten freien Fettsäuren auf die Funktion von Hypothalamus und Hypophyse durch Feedbackmechanismen wahrscheinlich.

## 1.2 Fragestellung: Die Bedeutung des ACTH-Rezeptors für Differenzierung und Fettsäurestoffwechsel von Adipozyten

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologische und pathologische Relevanz des ACTH-Rezeptors auf Adipozyten genauer zu charakterisieren. Hierfür wurde ein *in vitro* Modell mit stabilem Mc2-R *knockdown* (kd) in 3T3-L1 Präadipozyten etabliert, bei dem durch dauerhafte Expression von *short hairpin RNA* (shRNA) eine Suppression des Rezeptors auch in differenzierten Adipozyten erfolgt. Anhand dieses Modells wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt und mikroskopische, molekulare und gaschromatographische Daten analysiert.

Die grundlegenden Fragen, mit denen sich die vorliegende Dissertation beschäftigt sind folgende:

1. Hat der Mc2-R einen Einfluss auf die reguläre Differenzierung von Adipozyten?
2. Führt der *knockdown* zu Veränderungen in der Expression von Genen, die Differenzierung und Lipolyse regulieren?
3. Hat der Mc2-R Einfluss auf die Lipidakkumulation und Lipolyse?
4. Hat der Mc2-R Einfluss auf die Lipidzusammensetzung und den Lipidgehalt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine 3T3-L1 Präadipozyten verwendet, die nach Kontaktinhibition bzw. Induktion zu Adipozyten ausdifferenzieren.

#### ***Knockdown***

Die verwendeten Präadipozyten waren mit einem retroviralen pSIREN-Vektor System mit shRNA stabil transfiziert. Nach Bindung der shRNA an die Ziel-mRNA wird intrazellulär ein „Abwehrsystem“ aktiviert und diese mRNA vorzeitig abgebaut. Die verwendeten shRNA Sequenzen wurden in die BamHI und EcoRI Regionen des pSIREN-RetroQ Plasmids (Clontech) und somit in die retrovirale Sequenz geklont. Sie zielten auf den Mc2-R ab, um dessen Expression herabzuregulieren.

Die vier generierten *knockdown* Zelllinien wurden als kd A bis D bezeichnet. Diese wurden mit zwei Kontrollzelllinien verglichen, die mit dem gleichen retroviralen pSiren-Vektor transfiziert waren. Hier zielten die zerkleinerten shRNA Sequenzen jedoch auf kein Mausgen ab und blieben somit ohne Einfluss auf die Expression des Mc2-R. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden mittels der pSiren-Vektor-vermittelten Puromycinresistenz selektiert. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Dr. D. Hadaschik (Cambridge) zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	shRNA Zielsequenz
kd A	GTCAAGCATTAGTGACAAA
kd B	GCATATTGGAGAACTTGAT
kd C	GCAACCGGTATTAGTAGAA
kd D	GGTAACCAATACTCTAGAA
Con I	GTAGCGACTAAACACATCAA
Con II	GTAAGGCTATGAAGAGATAC

**Tabelle 1**      **Verwendete shRNA Sequenzen**

#### ***Kultivierung***

Um bei der Zellkultivierung größtmögliche Sterilität zu gewährleisten wurden alle Arbeiten stets in der sterilen Werkbank durchgeführt, verwendeten Materialien desinfiziert, sterile oder autoklavierte Röhrchen benutzt und Lösungen, soweit möglich, steril filtriert.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Präadipozyten erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 25 ml NCS-Medium im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden.

### **Passagierung**

Da interzellulärer Kontakt zur Differenzierungsinduktion führt, mussten die Präadipozyten stets im Stadium der Subkonfluenz gehalten und bereits bei einer Konfluenz von etwa 40 % passagiert werden. Bei einer Verdopplungszeit von durchschnittlich 24 Stunden erfolgte die Passagierung alle 2 bis 4 Tage. Hierzu wurde nach Entfernen des Nährmediums mit 8 ml *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und die Zellen anschließend durch Zugabe von 3 ml 0,05 % Trypsin/ *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) vom Flaschenboden gelöst. Die Trypsinierung erfolgte für 2 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Leichte Erschütterungen der Flasche gewährleistete die vollständige Ablösung vom Boden. Der Verdau wurde durch Aufnahme der Zellen in 10 ml frischem NCS-Medium gestoppt. Diese Suspension wurde für 3 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 1200 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspendieren der Zellen in 1 ml NCS-Medium wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Aussaat in der gewünschten Zelldichte erfolgte anschließend in frischem NCS-Medium in Zellkulturflaschen bzw. -platten.

### **Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl NCS-Medium verdünnt, so dass eine Konzentration von 10 % erreicht wurde. Die Zählung der Zellen erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer, in der jedes der 16 Quadrate einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Zur Angabe der Zellzahl pro ml wurde der Mittelwert der Zählung aus vier Quadranten mit dem Faktor 10.000 multipliziert.

### **Kryokonservierung**

Um die Passagezahl möglichst gering zu halten wurde ein Teil der Zellen nach kurzer Vermehrungsperiode bis zur weiteren Verwendung in Tiefkühlschränken bei -80°C bzw. in Stickstofftanks bei -196°C gelagert. Zum Einfrieren wurde bis zur Resuspension der Zellen analog zur Passagierung vorgegangen, das verwendete NCS-Medium nun aber mit 10 % steril filtriertem Dimethylsulfoxid versetzt. Je 1,5 ml der Suspension wurden in speziellen Tiefkühlröhrchen mittels einer mit Isopropylalkohol gefüllten Einfrierhilfe bei -80°C für mindestens 24 Stunden gelagert. Der Isopropylalkohol sichert dabei ein schonendes Abkühlen der Zellen, wodurch Kristallbildung verhindert wurde. Anschließend erfolgte die Lagerung der Dauerkulturen bei -80°C bzw. -196°C.

### **Auftauen**

Um den toxischen Effekt des Dimethylsulfoxid bei RT möglichst gering zu halten wurden die Dauerkulturen so rasch als möglich aufgetaut und mit Medium verdünnt. Hierzu wurden die Zellen im 37°C warmen Wasserbad zur Ablösung von der Gefäßwand kurz angetaut und anschließend mit 10 ml vorgewärmtem NCS-Medium verdünnt. Die Suspension wurde für 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das resuspendierte Zellpellet wurde mit 25 ml NCS-Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesäht und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Zur Schonung der empfindlichen Zellen enthielt das Medium in den ersten 48 Stunden noch kein Puromycin. Nach 2-3 Tagen waren die Zellen gut angewachsen und konnten in größere Flaschen überführt werden.

### **Differenzierung**

Nach Kontaktinhibition durchliefen die verwendeten Zellen eine Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten; dies konnten mikroskopisch anhand von Formveränderung und Akkumulation ringförmig angeordneter Lipidtröpfchen verfolgt werden. Durch Zusatz von Stimulanzen war es möglich, diesen Prozess zu beschleunigen (22).

Zur Differenzierung wurden die Präadipozyten bis zur vollständigen Konfluenz in NCS-Medium kultiviert. An Tag 2 post Konfluenz erfolgte die Induktion durch Zugabe eines Differenzierungscocktails; dieser Tag wurde als Tag 0 definiert. Ab Tag 3 post Induktion erfolgte die Kultivierung in *Foetal Bovine Serum* (FBS)-Medium versetzt mit 20 nM Insulin.

### **Fotographische Dokumentation**

Zu Dokumentations- und Vergleichszwecken wurden regelmäßig Fotos der Zellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten aufgenommen. Zur Einschätzung der Größe dienten Vergleiche mit Ablichtungen einer Neubauerzählkammer.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
NCS-Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) + GlutaMAX	Gibco
	10 % NCS	Gibco
	1 % Penicillin/ Streptomycin	Gibco
	0,1 % Puromycin	Gibco
FBS-Medium	DMEM + GlutaMAX	Gibco
	10 % FBS	Gibco
	1 % Penicillin/ Streptomycin	Gibco
Differenzierungscocktail	0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine	Fluka
	1 mM Dexamethason	Sigma



	20 nM Insulin	InsumanRapid
--	---------------	--------------

**Tabelle 2**      **Zusammensetzung der Medien für Zellkultur und Differenzierung**

Reagenz/ Gerät	Hersteller
DPBS	Gibco
0,05 % Trypsin/ EDTA	Gibco
Dimethylsulfoxid	Sigma
Isopropanol wasserfrei	Sigma
Zellkulturflaschen und Mehrlochplatten	BD Falcons
Pipetten und gestopfte Pipettenspitzen ( <i>Biosphere Filter Tips</i> )	Eppendorf
Tiefkühlröhrchen ( <i>CryoPure Tubes</i> , 1,8 ml)	Sarstedt
Einfrierhilfe (1°C <i>CryoFreezing Container</i> )	Nalgene
Eppendorfröhrchen ( <i>SafeSeal Micro Tubes</i> )	Sarstedt
Fotoapparat SP500UZ	Olympus
Inkubator Hera cell 150	Heraeus
Mikroskop IM 35	Zeiss
Zentrifuge Typ 1300	Hettich Universal 2S
Stickstofftank LS 750	Taylor-Wharton Lab Systems

**Tabelle 3**      **Für Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte**

## 2.2 Gewebeproben

### ***Versuchstiere***

Gewebeproben für folgende Versuche wurden Mäusen des Stammes „Sv 129“ entnommen. Eine Anzeige zur Tötung der Versuchstiere und Organentnahme erfolgte bei der Regierung von Oberbayern.

### ***Präparation***

Zur Isolation von RNA und Fettsäuren aus murinem Fettgewebe wurden die Versuchstiere mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Fell abgezogen und subkutane sowie perigonadale Proben präpariert und entnommen. Die gewonnenen Gewebestücke wurden gewogen (ca. 100 - 150 mg) und unter sterilen Bedingungen in Stücke zu jeweils 10 - 20 mg zerkleinert. Diese wurden dann dreimal mit sterilem, kaltem DPBS gewaschen und 1 Minute bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die

Proben 24 Stunden in Präparationsmedium im Inkubator gelagert um stressbedingte Reaktionen abklingen zu lassen. Am nächsten Tag erfolgte dreimaliges Waschen mit sterilem DPBS und anschließendem Zentrifugieren für 1 Minute bei RT. Nach gleichmäßigem Verteilen der Proben in 3 x 3 Ansätze in 6-Loch-Platten wurden je 2 ml *Fat-Pad-Medium* zur 24 stündigen Stimulation hinzugegeben. Diese erfolgte mit DPBS, 1  $\mu$ M Noradrenalin und 100 nM ACTH im Inkubator. Nachstimulation in den letzten 6 Stunden erfolgte durch direkte Zugabe der Stimulanzen in das Medium.

### **Aufarbeitung**

Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und eingefroren, die Gewebeproben nach dreimaligem Waschen mit sterilem DPBS auf Trockeneis schockgefroren. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Trockeneis. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff gemörser, bis dieser vollständig verdampft war. Das verbleibende Pulver wurde gleichmäßig auf 2 Eppendorfröhrchen verteilt und mit geöffnetem Deckel auf Trockeneis gelagert, um den restlichen Stickstoff verdampfen zu lassen. Danach erfolgte die Lagerung bei -80°C. Vor der RNA-Extraktion wurden die Proben nach Zugabe von Lysepuffer durch Spritzen mit absteigendem Durchmesser gezogen, um eine homogene Flüssigkeit zu erhalten.

### **Weitere Verwendung**

Wegen inkonstanten Ergebnissen bei sehr geringen n-Zahlen wurden die Ergebnisse dieser Versuchsreihe in der vorliegenden Dissertation nicht weiter verwendet. Der Versuchsaufbau wird in folgenden wissenschaftlichen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe Verwendung finden.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
Präparationsmedium	DMEM F12 10 % FBS 1 % Penicillin/ Streptomycin	Gibco Gibco Gibco
Fat-Pad-Medium	DMEM F12 1 % Penicillin/ Streptomycin 10 mg/ ml <i>Fatty Acid Free Bovine Serum Albumin</i>	Gibco Gibco Gibco
Noradrenalin: $c(\text{stock solution})=10^{-7}$ nM	16 $\mu$ l Arterenol 984 $\mu$ l DPBS	Sanofi Aventis Gibco
ACTH: $c(\text{stock solution})=10^{-5}$ M	117 $\mu$ l Synacthen 883 $\mu$ l DPBS	Novartis Gibco

**Tabelle 4**      **Zusammensetzung der Medien für Präparation und Stimulation von Gewebeproben**

Reagenz/ Gerät	Hersteller
Isofluran (Florene)	Abbott
DPBS	Gibco
Zellkulturflaschen und Mehrlochplatten	BD Falcons
Pipetten und gestopfte Pipettenspitzen ( <i>Biosphere Filter Tips</i> )	Eppendorf
Eppendorfröhrchen ( <i>SafeSeal Micro Tubes</i> )	Sarstedt
Inkubator Hera cell 150	Heraeus
Zentrifuge Typ 1300	Hettich Universal 2S

**Tabelle 5** Für Präparation von Gewebeproben verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte

## 2.3 RNA-Extraktion

Um die genetische Expression adipozytärer Marker auf mRNA-Ebene zu untersuchen wurde zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten sowie nach Behandlungen der Zellen mit Stimulanzen die gesamte RNA extrahiert. Dabei wurde auf besonders sterile Arbeitsbedingungen geachtet, um eine Hydrolyse der RNA durch ubiquitär vorkommende *Ribonucleasen* zu vermeiden. Daher kamen nur steril gestopfte Pipettenspitzen sowie *Ribonuclease*-freie Eppendorfgeläße und Lösungen zum Einsatz.

### **Durchführung**

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden dem RNA-Isolationskit *SV 96 Total RNA Isolation System* von Promega entnommen. Die Isolierung erfolgte, wenn nicht anderweitig angegeben, aus 6-Loch-Platten. Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurden je 175 µl *SV RNA Lysis Buffer* in 6-Loch-Platten bzw. je 100 µl in 24-Loch-Platten gegeben. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren bis zur Entstehung eines weißen Niederschlags wurden die Zellen abgelöst und in sterile Eppendorfröhrchen überführt. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurden diese wiederholt durch eine feine Spritze gezogen. Nach Zugabe von 350 bzw. 200 µl *SV RNA Dilution Buffer* wurden die Proben 3 Minuten bei 70°C im Heizblock inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 13000 rpm und RT wurde der Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen transferiert und die RNA durch Zugabe von jeweils 200 bzw. 114,3 µl 95 % Ethanol ausgefällt und in *SpinBasketTubes* gegeben. Nach 1 Minute Zentrifugieren bei 13000 rpm und Verwerfen des Eluats folgte die Zugabe von 600 µl *Wash Solution* sowie das erneute Zentrifugieren für 1 Minute bei 13000 rpm. Auf die Membran wurde nun 50 µl *DNAse Incubation Mix* gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 200 µl *Stop Solution*, 1 Minute in der Zentrifuge bei

13000 rpm und das Verwerfen des Eluats. Diese Schritte erfolgten auch jeweils nach der Zugabe von 600 bzw. 250 µl *Wash Solution*, beim zweiten Durchlauf für 2 Minuten. Nach dem Übertragen der Säule auf ein neues Röhrchen und der Zugabe von 100 µl *Nuclease-Free Water* auf die Membran sowie einer Inkubation von 2 Minuten bei RT erfolgte 1 letzte Minute in der Zentrifuge und das Verwerfen der Säule. Die Röhrchen wurden sofort auf Trockeneis gelagert bzw. bei -80°C eingefroren.

#### ***Photometrische Konzentrationsbestimmung***

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgt durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei  $A_{260} = 1,0$  einer Konzentration von 40 µg RNA/ ml entsprach. Die photospektrometrische Messung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop. Zur Initialisierung des Gerätes wurde zunächst 1 µl doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) als Referenzwert eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 1,2 µl der extrahierten RNA gemessen.

#### ***Überprüfung der Reinheit***

Vor der weiteren Verwendung wurde die Reinheit der isolierten RNA überprüft. Hierfür wurde zunächst die Absorptionskurven der photometrischen Konzentrationsbestimmung sowie der Quotient aus  $A_{260} / A_{280}$  beurteilt, der zwischen 1,7 und 2,1 liegen sollte.

Daneben wurde die Integrität der isolierten RNA durch Gelelektrophorese in 2 % Agarose/ Tris-Borat-EDTA (TBE) - Gel untersucht. Dazu wurde zunächst das Agarosegel hergestellt und auf etwa 60 °C erhitzt, mit 2 µl/ 100 ml Ethidiumbromid unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen versetzt und etwa 1 cm hoch in eine Laufkammerform gegossen. Nach dem Abkühlen und Überführen des Gels in eine mit TBE-Puffer gefüllte Laufkammer wurde in jede Kavität 10 µl der RNA-Laufmischung sowie 5 µl einer 1 *kilo base pairs* (kbp) DNA-Leiter zum Vergleich aufgetragen. Der Gellauf erfolgte 30 Minuten bei einer Spannung von 80 Volt. Durch das zugegebene Ethidiumbromid konnte die gefärbte ribosomale RNA im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Bei reiner RNA ist das Verhältnis von 28S-RNA zu 18S-RNA 2:1. Größere Kontaminationen oder Degradierungen der Proben konnten hierdurch ausgeschlossen werden. Ein Ausdruck der sichtbaren Banden erfolgte zur Dokumentation.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
DNase Incubation Mix	40 µl <i>Yellow Core Buffer</i> 5 µl Mangan(II)-chlorid (MnCl <sub>2</sub> ) (0,09 M) 5 µl DNase I	Promega Promega Promega
Agarosegel	1 g PEQGold Universal Agarose Pulver 100 ml TBE-Puffer (10xTBE) 2 µl Ethidiumbromidlösung, 1 %	PEQ Hausapotheke Roth

Laufmischung	8 µl <i>Nuclease-free-Water</i>	Promega
	1 µl RNA	
	2 µl 6x <i>Loading Dye Solution</i>	Fermentas

**Tabelle 6**                    **Zusammensetzung und Inhaltsstoffe für RNA-Extraktion**

Reagenz/ Gerät	Hersteller
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
NanoDrop ND1000 Spectrophotometer	ThermoFisherScientific
Software ND 1000 V3.60	NanoDrop
Gel-Gießkammer/ Gel-Laufkammer Subcell GT	Biorad
DNA-Leiter ( <i>BenchTop 1 kbp DNA Ladder</i> )	Promega
UV-Lampe und Software IntasGellmagier UVSysteme	Intas

**Tabelle 7**                    **Für RNA-Extraktion verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte**

## 2.4 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde durch das Verfahren der reversen Transkription ein cDNA Strang synthetisiert.

### **Durchführung**

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden dem Transkriptionskit *M-MLV Reverse Transcriptase* von Promega entnommen, das Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers. Während der Verarbeitung wurden RNA und Lösungen fortwährend auf Eis gelagert.

Für die Umschreibung in cDNA wurden 500 ng der extrahierten RNA entnommen und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgestockt. Diesem Ansatz wurden je 0,5 µg *Oligo(dt)<sub>15</sub>-Primer* zugefügt und anschließend zur Denaturierung der RNA 5 Minuten bei 70°C im *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Gerät inkubiert. In den anschließenden 5 Minuten wurden die Proben auf Eis gekühlt. Jeder Probe wurden 12 µl des zuvor präparierten Mastermixes zugegeben. Die anschließende Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 40°C ermöglichte die Anlagerung der Primer an die mRNA. In den folgenden 50 Minuten bei 48°C erfolgt die reverse Transkription, die letzten 15 Minuten bei 70°C inaktivierten das Enzym. Im Anschluss wurde die cDNA im Tiefkühlschrank bei -18°C gelagert.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
Mastermix	5 µl <i>M-MLV RT 5xBuffer</i> 1 µl <i>rRNasin RNase Inhibitor</i> 1,25 µl dNTP Mix (c = 10 mmol) 3,75 µl ddH <sub>2</sub> O 1 µl <i>M-MLV RT, RNase H(-) Point Mutant</i>	Promega Promega Promega Braun Promega

**Tabelle 8**      **Zusammensetzung und Inhaltsstoffe für Reverse Transkription**

Reagenz/ Gerät	Hersteller
<i>Oligo(dt)<sub>15</sub> Primer</i>	Promega
Pipetten und gestopfte Pipettenspitzen ( <i>Biosphere Filter Tips</i> )	Eppendorf
PCR Gerät Advanced primus 25	PEQLab

**Tabelle 9**      **Für Reverse Transkription verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte**

## 2.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

### *Prinzip*

Das Verfahren der qRT-PCR ermöglicht durch das Synthetisieren mehrerer Millionen Kopien einer DNA-Vorlage die Analyse bereits geringster Mengen genetischen Materials. Hierfür wird die gewünschte DNA-Sequenz mit spezifischen Primerpaaren flankiert und mit jedem Zyklus der PCR verdoppelt. Bei dem verwendeten *Multiplex Quantitative PCR System Mx3000 Pro* von Stratagene lagert sich der Farbstoff *SYBR Green* in einer Vertiefung der entstehenden doppelsträngigen DNA-Fragmente an und gibt bei Anregung ein Fluoreszenzsignal ab. Dieses Signal wird nach jedem Replikationszyklus gemessen und steigt proportional zur Menge des PCR-Produktes in der Reaktion an. Im Bereich der exponentiellen Phase dieses Anstiegs wird für jede signifikant über dem Grundwert liegende Messung ein Fluoreszenzschwellenwert festgelegt. Hierdurch kann der sogenannte *cycle threshold* (Ct) - Wert der Probe bestimmt werden, der definiert ist als die Zyklusanzahl bei der das Fluoreszenzsignal den festgelegten Schwellenwert übersteigt. Der Ct-Wert ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich vorhandenen Anzahl der DNA-Matrizen in der Probe. Die Steigung der Kurve im Bereich des exponentiellen Anstiegs ermöglicht es, die Effizienz der Reaktion zu berechnen. Aus allen Probenmesswerten wird eine Standardkurve erstellt, aus der sich die PCR-Effizienz bestimmen lässt. Der Ct-Wert wird in jeder Probe für den fokussierten Marker sowie für ein Referenzgen gemessen, dessen Expression im untersuchten System nicht reguliert wird und zur Normalisierung herangezogen werden kann. Nach abgeschlossener Amplifikation wird über einen graduellen Temperaturanstieg eine Schmelzkurve generiert, die über das Absinken der

Fluoreszenz die Schmelzpunkte entstandener Produkte bestimmt. Schmelzpunkte unter 75°C entstammen meist unspezifischen Nebenprodukten. So kann kontrolliert werden, ob tatsächlich das gewünschte Produkt quantifiziert wurde.

### **Durchführung**

Alle verwendeten Lösungen wurden dem *iQ SYBR Green Kit* von Biorad entnommen. Um die Auswirkung von Pipettierungenauigkeiten zu verringern wurden stets Doppelbestimmungen angesetzt. Eine Wasserkontrolle diente dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse durch DNA-Verunreinigungen, 18s wurde als Referenzgen eingesetzt. Als Kalibrator dienten Wildtypzellen von Tag 9 (siehe 2.1).

Zu 2 µl cDNA wurden je 10 µl des jeweiligen Mastermixes pipettiert. Nach kurzem Zentrifugieren der Proben wurden die Platten entsprechend dem Standardprotokoll im *Thermocycler* inkubiert.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
Mastermix	0,5 µl <i>Forward (fwd) Primer</i>	Biorad
	0,5 µl <i>Reverse (rev) Primer</i>	Biorad
	3 µl ddH <sub>2</sub> O	Biorad
	6 µl <i>iQTM SYBR Green Supermix</i>	Biorad

**Tabelle 10**      **Zusammensetzung und Inhaltsstoffe des Mastermixes für qRT-PCR**

### **Standardprotokoll**

- 1 x      3 Minuten bei 95°C
- 40 x    10 Sekunden bei 95°C
- 30 Sekunden bei 60°C
- 30 Sekunden bei 72°C
- 1 x      60 Sekunden bei 95°C
- 30 Sekunden bei 55°C
- 30 Sekunden bei 95°C

### **Primer**

Die verwendeten Primersequenzen wurden teilweise aus der laborinternen Datenbank entnommen, teilweise mit dem Programm Jellyfish Version 1.5 (LabVelocity) neu entworfen.

Gen	Primer-Sequenz	
18s	fwd	5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3'

	rev	5'-GTC GGA ATT ACC GCG GCT-3'
	<i>Probe</i>	5'-GAG GGC AAG TCT GGT GCC AG-3'
AAC $\alpha$	fwd	5'-GCC TCT TCC TGA CAA ACG AG-3'
	rev	5'-TGA CTG CCG AAA CAT CTC TG-3'
ATGL	fwd	5'-GTG GCC AAC GCC ACT CAC ATC TAC-3'
	rev	5'-CAC GGA TGG TCT TCA CCA GGT TGA-3'
D5D	fwd	5'-CCC TTC ATC CTC TGT GCA GTA CT-3'
	rev	5'-GGT GCC CAA AGT CAT GCT GTA-3'
D6D	fwd	5'-CAT AAA GAG CCT GCA TGT GTT TG-3'
	rev	5'-GGG CAG GTA TTT CAG CTT CTT C-3'
Elovl5	fwd	5'-TGC GTC ACT CAG TAC CTA TTT CAA G-3'
	rev	5'-TGT AAT TGT CCA GGA GGA ACC A-3'
Elovl6	fwd	5'-CCC GAA CTA GGT GAC ACG AT-3'
	rev	5'-CCA GCG ACC ATG TCT TTG TA-3'
FAS	fwd	5'-GGA GGT GGT GAT AGC CGG TAT-3'
	rev	5'-TGG GTA ATC CAT AGA GCC CAG-3'
HSL	fwd	5'-GGA GCA CTA CAA ACG CAA CGA GAC A-3'
	rev	5'-CCA GAG ACG ACA GCA CCT CAA TCT C-3'
LPL	fwd	5'-CAG CTG GGC CTA ACT TTG AG-3'
	rev	5'-AAT CAC ACG GAT GGC TTC TC-3'
Mc2-R (I)	fwd	5'-CTG CCA CGA GGC TTA AGA TAA C-3'
	rev	5'-GCC TGT CAA GCA TTA GTG ACA A-3'
Mc2-R (II)	fwd	5'-TGC CGA GAA AGA TCC TAC TTC AG-3'
	rev	5'-TCC TTG GCT TTT GTC ACT AAT GC-3'
Perilipin	fwd	5'-TGG ACC ACC TGG AGG AAA AG-3'
	rev	5'-TTC GAA GGC GGG TAG AGA TG-3'
PPAR $\gamma$ 1	fwd	5'-TTT AAA AAC AAG ACT ACC CTT TAC TGA AAT T-3'
PPAR $\gamma$ 2	fwd	5'-GAT GCA CTG CCT ATG AGC ACT T-3'
PPAR $\gamma$	rev	5'-AGA GGT CCA CAG AGC TGA TTC-3'
Pref-1	fwd	5'-GAC CCA CCC TGT GAC CCC-3'
	rev	5'-CAG GCA GCT CGT GCA CCC-3'



Pref-1 (II)	fwd	5'-TGC AAG GAA CCA TGG CAG TGC-3'
	rev	5'-ATT GAT CAC GCA GGG CCC AG-3'
SCD1	fwd	5'-TTC TTG CGA TAC ACT CTG GTG C-3'
	rev	5'-CGG GAT TGA ATG TTC TTG TCG T-3'

**Tabelle 11** Für qRT-PCR verwendete Primersequenzen

### **Auswertung**

Die statistische Auswertung sowie Diagrammerstellung erfolgte mit Hilfe von Excel (Microsoft).

Reagenz/ Gerät	Hersteller
PCR Röhrchen ( <i>Multiply-μStrip</i> ) und Platten (96 <i>Multiply PCR Plate</i> )	Sarstedt
gestopfte Pipettenspitzen	Sarstedt
Thermocycler Mx3000P	Stratagene
Software MxPro QPCR Software V 4.01	Stratagene

**Tabelle 12** Für qRT-PCR verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte

## **2.6 Oil-Red-O Färbung**

Um die Lipideinlagerungen und somit die Adipozytendifferenzierung zu objektivieren, wurden die Zellen mit *Oil-Red-O* (Bengalrot) behandelt, einem für Lipide spezifischem roten Farbstoff.

### **Präparation der Medien**

Zunächst wurde eine 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung sowie die *Oil-Red-O* Stammlösung hergestellt. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde die Stammlösung mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 3:2 vermischt, 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend durch einen 0,45 μm Sterilfilter filtriert.

### **Durchführung**

Nach einer Waschung mit 3 ml DPBS wurden die Zellen 5 Minuten in 0,5 ml Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurde zweimal mit je 1 ml DPBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und dann mit 1 ml 60 % Isopropanol gespült. Die Färbung mit jeweils 1 ml Arbeitslösung *Oil-Red-O* erfolgte für 30 Minuten. Danach wurde mit 1 ml 60 % Isopropanol und anschließend mit 1 ml DPBS gewaschen. Damit war die Färbung abgeschlossen, die Platten wurden mit 2 ml DPBS pro Kavität versorgt und bei 4°C aufbewahrt.

### **Quantifizierung der Lipidmenge**

Zur Quantifizierung der Lipidmenge wurde die optische Dichte jeder Kavität photometrisch ermittelt. Hierfür wurde nach Absaugen des DPBS 100 % Isopropanol zugegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Zum Auswaschen der *Oil-Red-O* Färbung aus den Zellen wurde die Lösung einige Male auf- und abpipettiert, anschließend in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und die optische Dichte 0,5 Sekunden lang im Photometer bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen. Der Leerwert wurde mit 100 % Isopropanol ermittelt, Positivkontrolle sowie Vergleichswerte anhand einer Verdünnungsreihe.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
0,5 % Glutaraldehyd-Lösung	1 ml Glutaraldehyd, 25 wt. % in H <sub>2</sub> O 50 ml DPBS	Sigma Gibco
<i>Oil-Red-O</i> Stammlösung	2,5 mg <i>Oil-Red-O</i> 1 ml Isopropanol, 100 %	Sigma Sigma

**Tabelle 13** Zusammensetzung der Medien für *Oil-Red-O* Färbung

Reagenz/ Gerät	Hersteller
ddH <sub>2</sub> O	Braun
0,45 µm Sterilfilter (Fitropur S, pyrogenfrei)	Sarstedt
DPBS	Gibco
Isopropanol, 60 % (wasserfrei)	Sigma
Eppendorfröhrchen ( <i>SafeSeal Micro Tubes</i> )	Sarstedt
Photometer Tecan Spectra	SLT Labinstruments

**Tabelle 14** Für *Oil-Red-O* Färbung verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte

## 2.7 Lipolyseassay

Die Lipolyse stellt dem Körper bei Bedarf freie Fettsäuren zur Verfügung; dies erfolgt durch hydrolytische Spaltung von Triacylglycerin mittels Lipasen. Der Abbau führt über Di- und Monoacylglycerin zu Glycerin. Bei jedem Schritt entstehen freien Fettsäuren, die zur Energiegewinnung in die  $\beta$ -Oxidation eingespeist werden.

Verschiedene Hormone sind in der Lage, die Lipolyse in Adipozyten zu induzieren bzw. die Lipolyserate zu erhöhen. Dabei unterscheiden sich die Angriffspunkte; während Katecholamine wie Noradrenalin als direkte Sympathomimetika über Adrenozeptoren wirken, wird die Wirkung von ACTH über den Mc2-Rezeptor vermittelt. Der Vergleich der jeweiligen

Lipolyseraten ermöglicht es, den Einfluss des Mc2-R kd auf die lipolytische Kapazität der Adipozyten zu untersuchen.

Zur quantitativen Beurteilung der Lipolyserate wurde die Glycerinkonzentration im Überstand gemessen und an der jeweiligen Proteinmenge normiert.

### ***Stimulation***

Vier bis sechs Stunden vor Beginn des Experiments wurden die Zellen in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie mit frischem, ebenfalls serumfreiem Medium versorgt, welches mit den jeweiligen Stimulanzen versetzt wurde. Für die Negativkontrolle wurde DPBS zugefügt, die Positivkontrolle erfolgte mit  $10^{-7}$  nM Noradrenalin. Die Stimulation mit ACTH erfolgt in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 nM/ 10 nM). Die Zellen wurden in allen Ansätzen 6 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde die Glycerinkonzentration im Überstand gemessen, während die Zellen zur Bestimmung der Proteinkonzentration gesammelt wurden.

### ***Messung der Glycerinkonzentration***

Alle verwendeten Lösungen wurden dem *Free Glycerol Determination Kit* von Sigma entnommen. Zunächst wurde zur Generierung von Vergleichswerten eine Standardkurve mit der *Glycerol Standard Solution* in 0,5 mg/ ml Schritten erstellt. Anschließend wurde das *Free Glycerol Reagent* in 40 ml *MilliQ Water* resuspendiert. Zur Messung der Glycerinkonzentrationen der Proben wurden je 150 µl der Überstände in eine 96-Loch-Zellkulturplatte übertragen und jeweils 150 µl des *Free Glycerol Reagent* zugegeben. Es erfolgten immer doppelte Ansätze. Nach einer Inkubationsdauer von 20 - 30 Minuten bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm in jeder Kavität spektrophotometrisch ermittelt.

### ***Proteinextraktion***

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden dem *Protein Assay Kit* von Biorad entnommen, das Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers.

Nach dem sorgfältigen Waschen der Zellen mit DPBS wurden je 250 µl (bis zu maximal 1 ml) *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer* zugegeben und kurz inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Die Suspension wurde in ein Eppendorfröhrchen überführt, welches sofort auf Eis gelagert wurde um ein Degradieren der Proteine zu verhindern. Nach 30 minütigem Zentrifugieren der Proben im Kühlraum wurde der Überstand abgenommen und die enthaltene Proteinkonzentration gemessen. Hierfür wurden die Proteinlysate im Verhältnis 1:10 verdünnt, hiervon 1 µl mit 99 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend mit 25 µl Bradford-

Assay vermischt. Die Absorption wurde bei 320 nm mit dem Programm „Bradford micro“ photometrisch bestimmt.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
Serumfreies Medium	DMEM+GlutaMAX 1 % Penicillin/ Streptomycin	Gibco Gibco
ACTH, $c$ (stock solution) = $10^{-5}$ M	117 $\mu$ l Synacthen 883 $\mu$ l DPBS	Novartis Gibco
Noradrenalin, $c = 10^{-7}$ nM	16 $\mu$ l Arterenol 984 $\mu$ l DPBS	Sanofi Aventis Gibco

**Tabelle 15**      **Zusammensetzung der Medien für Lipolyeassay**

Reagenz/ Gerät	Hersteller
DPBS	Gibco
Zellkulturflaschen und Mehrlochplatten	BD Falcons
Pipetten und gestopfte Pipettenspitzen ( <i>Biosphere Filter Tips</i> )	Eppendorf
Spektrophotometer VICTOR <sup>3</sup> 1420 <i>Multilabel Counter</i>	Perkin Elmer
<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>	eigene Herstellung
<i>Bradford-Assay</i>	Biorad
BioPhotometer	Eppendorf

**Tabelle 16**      **Für Lipolyseassay verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte**

## 2.8 Gaschromatographie

### *Prinzip*

Das Verfahren der Gaschromatographie ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse selbst sehr komplexer Stoffgemische. Diese Verteilungschromatographie trennt die eingespeiste Probesubstanz aufgrund von Struktur, Polarität und funktionellen Gruppen der Gasmoleküle durch unterschiedlich langes Verweilen an der stationären Phase einer Trennsäule auf. Am Ende dieser Säule zeichnet ein Detektor Austrittszeitpunkt und Menge der Substanz als Peak auf und bildet dies in einem Chromatogramm graphisch ab.

Schlecht zugängliche Substanzen wie Alkohole, Amine, Fettsäuren oder Zucker müssen hierfür zunächst durch Spaltung und Derivatisierung thermisch stabilisiert werden. Zur Analyse von Fettsäuren werden die Esterverbindungen aufgebrochen, um anschließend die entstehenden

freien Fettsäuren in ihre korrespondierenden Fettsäuremethylester zu überführen. Diese sind unpolar und kaum flüchtig, so dass sie für die gaschromatographische Analyse verwendet werden können.

Die Isolation, Extraktion und quantitative Bestimmung der Lipide erfolgte unter Modifikation der Versuchsbedingungen nach der Methode von Folch et al. (40).

### **Vorbereitung**

Vor der Fettsäureextraktion wurden die Zellproben in 0,5 ml DPBS aufgenommen und 3 x 10 Sekunden im Homogenisator lysiert. Nach dem Überführen des Zelllysats in 25 ml Schliffglasröhrchen wurden jeweils 100 µl des Internen Standards sowie 10 ml Chloroform/ Methanol/ Butylhydroxytoluol (BHT) - Lösung zugegeben. An 1 Minute vortexen schlossen sich 5 Minuten Inkubation im gekühlten Ultraschallbad an.

### **Extraktion**

Nach Zugabe von 2,5 ml ddH<sub>2</sub>O wurden die Röhrchen 15 Minuten leicht geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung 6 Minuten bei 2200 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abpipettiert, die verbleibende Flüssigkeit mit Methanol auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Zur zweiten Extraktion wurden 2,5 ml 2 % Natriumchlorid hinzugefügt und unter leichtem Schütteln 15 Minuten lang vermischt. Es schlossen sich erneut 6 Minuten zentrifugieren bei 2200 rpm und RT an. Nun wurde wieder die obere wässrige Phase abpipettiert, das verbleibende Gemisch mit Methanol bis auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Ausgenommen der Zugabe von Methanol wiederholt sich dieses Vorgehen auch bei der dritten Extraktion, bei der zuletzt die untere Schicht in einen Spitzkolben überführt wurde. Diese wurden bis zum weitgehenden Verdampfen der Flüssigkeit im Rotationsverdampfer bei 35°C belassen. Das Extrakt wurde in 400 µl Chloroform/ Methanol-Lösung aufgenommen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Nach zweimaligem Nachwaschen mit Chloroform wurde die Platte bis zur weitgehenden Sättigung in Laufmittel inkubiert, das nach Carnielli et al. als mobile Phase zur Auftrennung von Phospholipiden, freiem Cholesterin, freien Fettsäuren, Triacylglyceride und Cholesterinester dient (41). Nach dem Trocknen wurde die entwickelte Platte zur Visualisierung der aufgetrennten Fraktionen mit Dichlorofluorescein besprüht und unter UV-Licht betrachtet. Die gewünschten Phospholipid- und Triglyceridfraktionen wurden markiert und ausgekratzt. Das dabei gewonnene Kieselgel wurde in ein 4 ml Braunglas überführt. Nach Zugabe von 1,5 ml methanolischer HCl wurde die Flüssigkeit 45 Minuten bei 85°C im Thermoblock gekocht, anschließend ca. 30 Minuten zum Abkühlen belassen. Die Säure wurde mit Puffermischung neutralisiert.

Zur Extraktion der Methylester erfolgte nach der Zugabe von 1 ml Hexan und sorgfältigem Schütteln das Überführen der oberen Hexanphase in ein 2 ml Braungläschen. Dieses wurde nun nahezu vollständig unter Stickstoff eingedampft. Währenddessen wiederholte sich der Schritt mit der verbleibenden Suspension im 4 ml Braungläschen, die entstandene obere Phase wurde erneut in das jeweilige 2 ml Braungläschen überführt und unter Stickstoff eingedampft.

Das Extrakt wurde in 50 µl Hexan/ BHT-Lösung aufgenommen, gut geschüttelt und in ein Microvial überführt. Das Vial wurde anschließend im 2 ml Braunglas platziert, das aufgenommene Extrakt erneut unter Stickstoff eingedampft. Anschließend wurde nochmals 25 µl Hexan/ BHT-Lösung zugegeben und das Vial mit einer Bördelkappe gut verschlossen.

Bis zum Einspritzen in den Gaschromatographen wurden die Proben bei -80°C gelagert.

### ***Gaschromatographische Fettsäuremessung***

Nach sorgfältigem Schütteln wurden je 6 µl der Probe in den Gaschromatographen unter Verwendung einer polaren Trennsäule eingespritzt (42), die Chromatogramme mithilfe der *EZ-Chrom Elite* Software erstellt und ausgewertet. Der interne Standard diente dabei der Kalibrierung.

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung	Hersteller
Interner Standard	14,562 mg Phosphatidylcholine-Dipentadecanoyl in 100 ml Methanol/ Chloroform (35/ 15) + BHT (100 mg/ 50 mg) ➔ Endkonzentration 10µg C 15:0 / 100µl	Avanti Polar Lipids Merck Fluka-Analytical
Chloroform/ Methanol/ BHT- Lösung	Chloroform/ Methanol (2/ 1) + BHT (2,5 g/ l)	Merck/ Merck Fluka-Analytical
Chloroform/ Methanol-Lösung	Chloroform/ Methanol (1/ 1)	Merck/ Merck
Laufmittel	n-Heptan/ Diisopropylether/ Eisessig (60/ 40/ 3)	Merck/ Merck/ Merck
Puffermischung	Natriumsulfat/ Natriumhydrogencarbonat/ Natriumcarbonat (2/ 2/ 1)	Merck/ Merck/ Merck
Hexan/ BHT-Lösung	n-Hexan BHT (2 g/ l)	Merck Fluka-Analytical

**Tabelle 17      Zusammensetzung der Medien für Gaschromatographie**

Reagenz/ Gerät	Hersteller
DPBS	Gibco
Homogenisator Ultra-Turrax T8	IKA-Werke

Ultraschallbad Sonorex Super	Sonorex
Zentrifuge Universal 30F	Hettich
Methanol	Merck
Rotationsverdampfer Rotavapor R-114	Büchi
Dünnschichtchromatographieplatte TLC Silica gel 60 20 x 20 cm	Merck
Chloroform	Merck
2.7 Dichlorofluorescein	Merck
Thermoblock	Bachofer
n-Hexan	Merck
Gaschromatograph HP 5890 Series II GC	Agilent
Trennsäule BPX70 (Länge 25 m/ ID 0,22 mm/ Filmdurchmesser 0,25 µm)	SGE
Software EZ-Chrom Elite Version 3.1.7	Agilent

**Tabelle 18**      **Für Gaschromatographie verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte**

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Effektivität des Mc2-R kd

Zunächst wurde die Effektivität des Mc2-R kd in den ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten überprüft. Als Erfolg wurde dabei eine um mehr als 60 % verringerte Expression des Rezeptors in den generierten kd Zelllinien relativ zu den Kontrollen gewertet. Hierfür wurden die Expressionslevel des Mc2-R an Tag 9 mittels qRT-PCR ermittelt, anhand ihrer 18S mRNA-Level normiert und im Vergleich mit den Kontrollzelllinien bewertet (Abb. 3.1). Als Kontrollen dienten 3T3-L1 Zellen, die stabil mit einer unspezifischen shRNA transfiziert worden waren. Die *knockdown* Zelllinien wurden als kdA bis D, die Kontrollen als ConI und ConII bezeichnet. Von diesen Linien wurden kdD wegen ungenügender Expressionsreduktion sowie ConII wegen schlechter Differenzierung und somit Zeichen für *off-target* Effekte nicht weiter untersucht. Im Weiteren wurden somit die Linien kdA (Mc2-R Expression:  $38.2 \pm 6.9\%$ ), kB ( $16.7 \pm 3.1\%$ ) und kdC ( $32.0 \pm 11.5\%$ ) verwendet und ihre relative Expression im Vergleich zu ConI ( $100 \pm 38.7\%$ ) beurteilt.

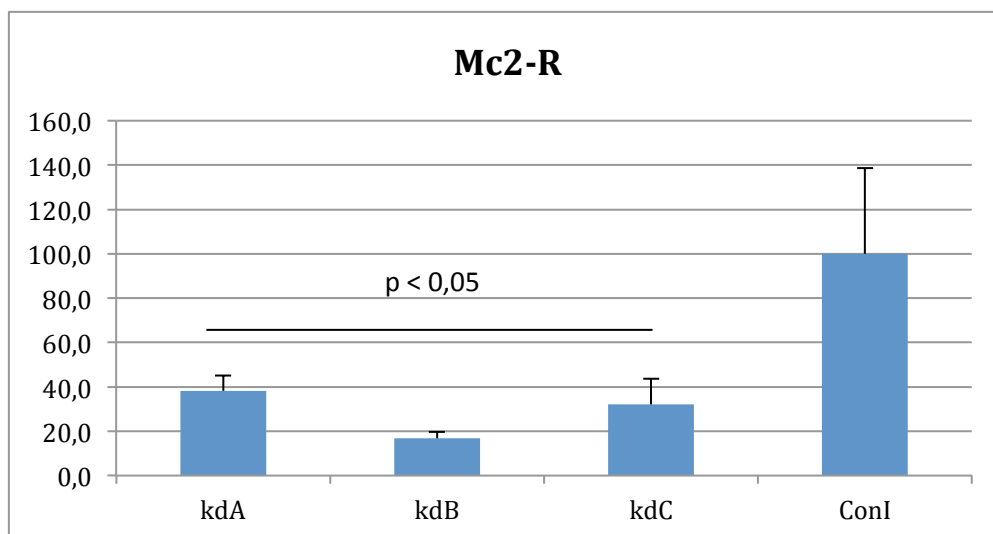


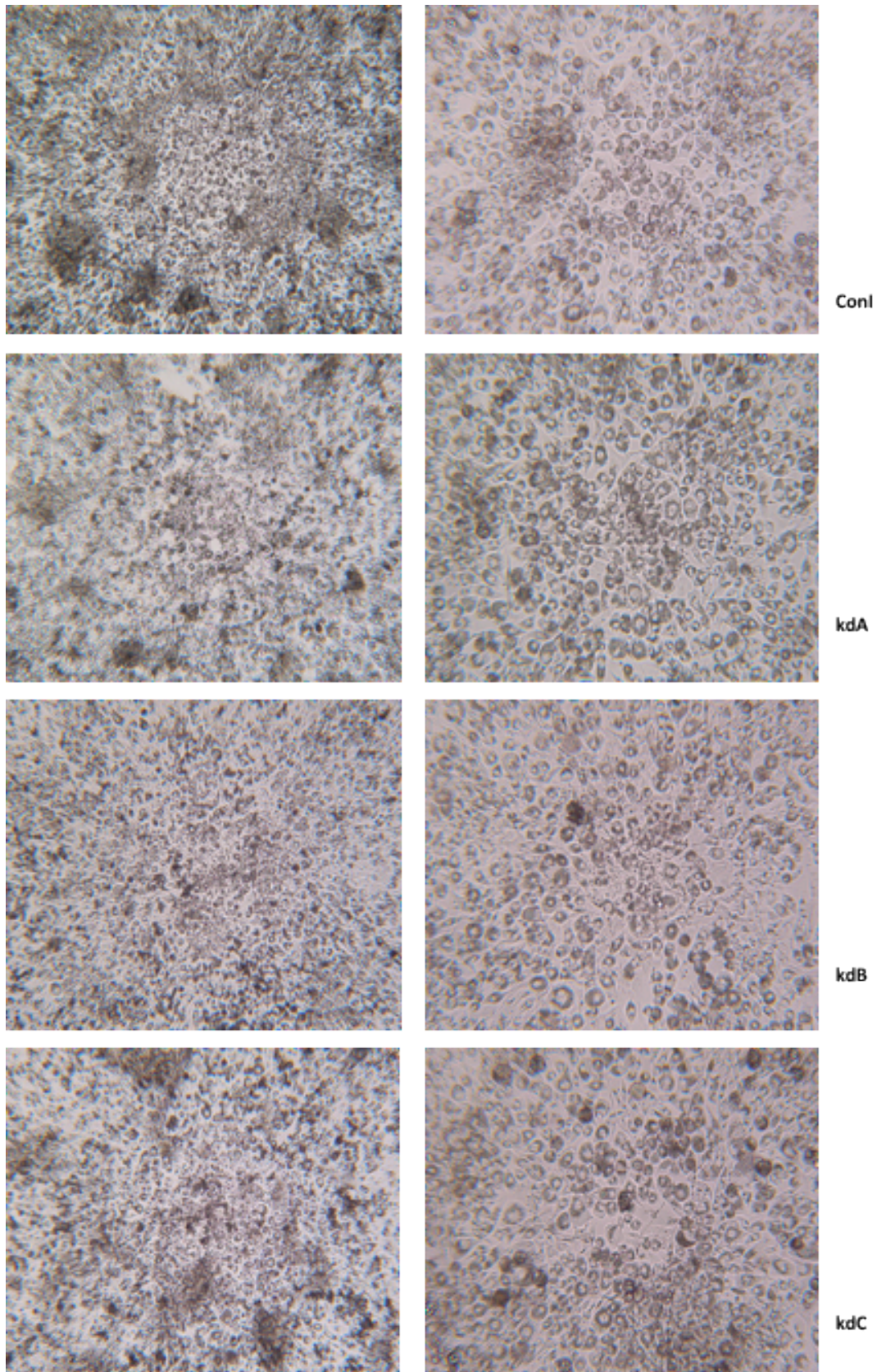
Abb. 3.1: mRNA Expressionslevel des Mc2-R (Tag 9) in [%] von ConI, gemessen mit qRT-PCR, normiert auf 18S mRNA. Die Zelllinien kdA, kB und kdC zeigen eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle.

#### 3.2 Mc2-R kd hat eingeschränkte Lipidakkumulation zur Folge

Anschließend wurde ein möglicher Einfluss des kd auf die Differenzierung der Präadipozyten untersucht. Diese kann morphologisch anhand des Wandels der Fibroblasten zu muren Adipozyten mit ringförmig angeordneten Lipidvakuolen verfolgt werden. Die Zelllinien wurden

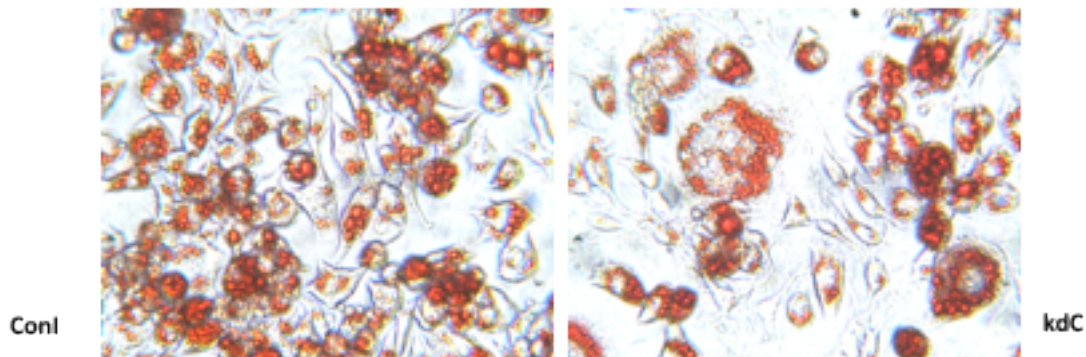


an Tag 9 lichtmikroskopisch hinsichtlich dieser Veränderungen verglichen. Es zeigten sich hier keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Übersichts- (4x) und Detailaufnahmen (10x) der differenzierten Adipozyten an Tag 9. Die Zelllinien zeigen keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede.

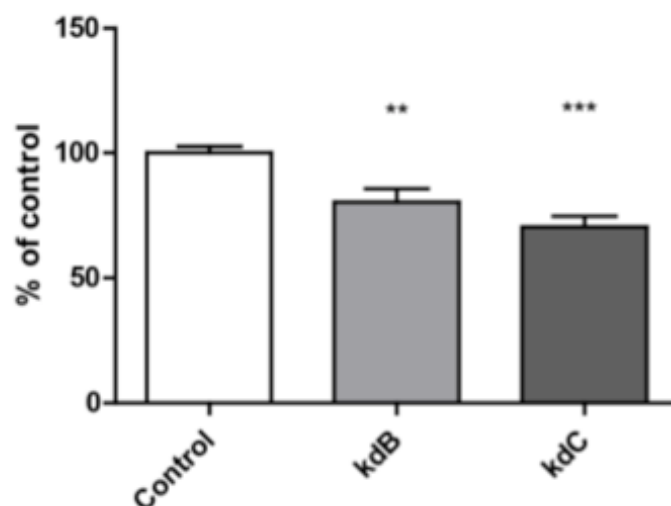
Um die akkumulierte Fettmenge und somit die Adipozytendifferenzierung besser zu beurteilen, wurden die Zellen nach der Färbung mit *Oil-Red-O* erneut verglichen. Auch hierbei zeigten sich keine lichtmikroskopisch detektierbaren Unterschiede (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild der Zelllinien nach der Behandlung mit *Oil-Red-O* im Vergleich. Die Lipidakkumulation erscheint vergleichbar.

Zur Objektivierung der lichtmikroskopischen Beobachtungen wurde anschließend die *Oil-Red-O* Färbung mit Isopropanol herausgelöst und die jeweilige Farbkonzentration im Überstand durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Die Absorptionsraten bei 530 nm wurden verglichen und somit die enthaltene Gesamtlipidmenge als indirekter Massstab des Differenzierungsgrades quantifiziert. Entgegen dem subjektiven Eindruck der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigte sich die Lipidmenge in den kd Linien signifikant erniedrigt (Conl  $100 \pm 2.5\%$ , kdB  $80.3 \pm 5.4\%$ ,  $p < 0.01$ , kdC  $70.4 \pm 4.3\%$ ,  $p < 0.001$ ) (Abb. 3.4).

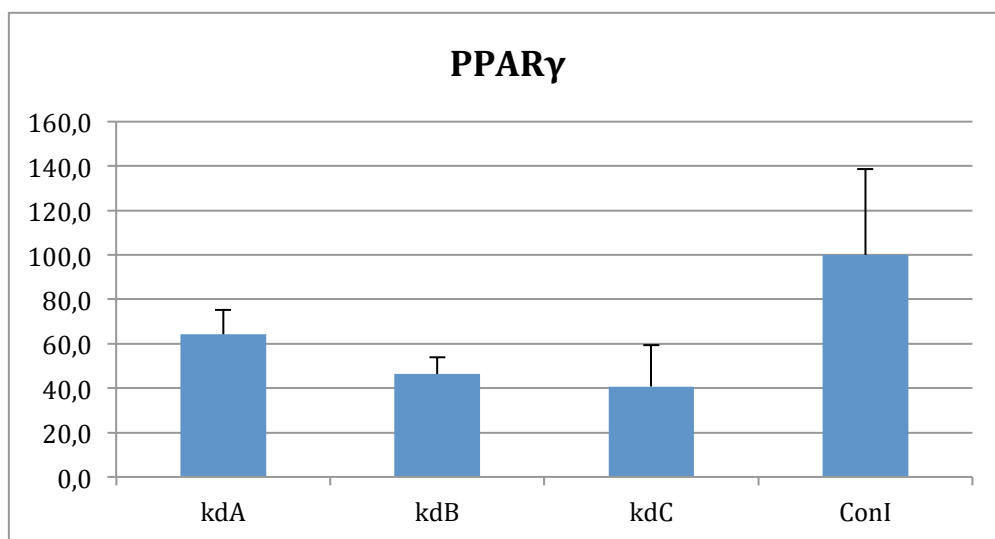
**Abb. 3.4:** Vergleich der extrahierbaren *Oil-Red-O* Menge zur Quantifizierung der Lipidmenge.



Absorptionsraten bei 530 nm, Angabe in [%] von Conl. Die kd Zelllinien zeigen signifikant erniedrigte Lipidmengen (\*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ ).

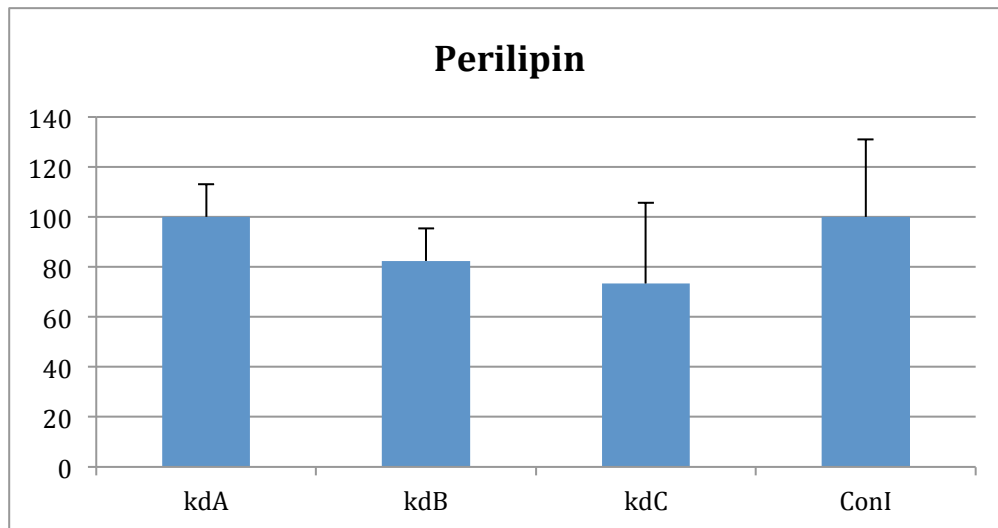
Die nur geringen morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien während der Differenzierung wurden anschließend auf molekularer Ebene mittels qRT-PCR weiter untersucht. Als Differenzierungsmarker wurden PPAR $\gamma$ , Perilipin und Pref-1 analysiert.

PPAR $\gamma$  steuert als Transkriptionsfaktor Zellentwicklung, -differenzierung und -wachstum. Nach Aktivierung durch ihre Liganden bilden PPARs Heterodimere, binden an spezielle Bindungsstellen in der Promoterregion ihrer Zielgene und regulieren so die Genexpression. Solch eine Bindungsstelle findet sich auch auf dem Mc2-R Promoter in Adipozyten, wo es die Adipogenese beeinflusst (43). PPAR $\gamma$  zeigte eine Tendenz für eine geringere Expression in den kd Linien (ConI 100 $\pm$ 38.7%, kdA 64.2 $\pm$ 11.2%, kB 46.3 $\pm$ 7.5%, kdC 40.8 $\pm$ 18.6%) ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 3.5).



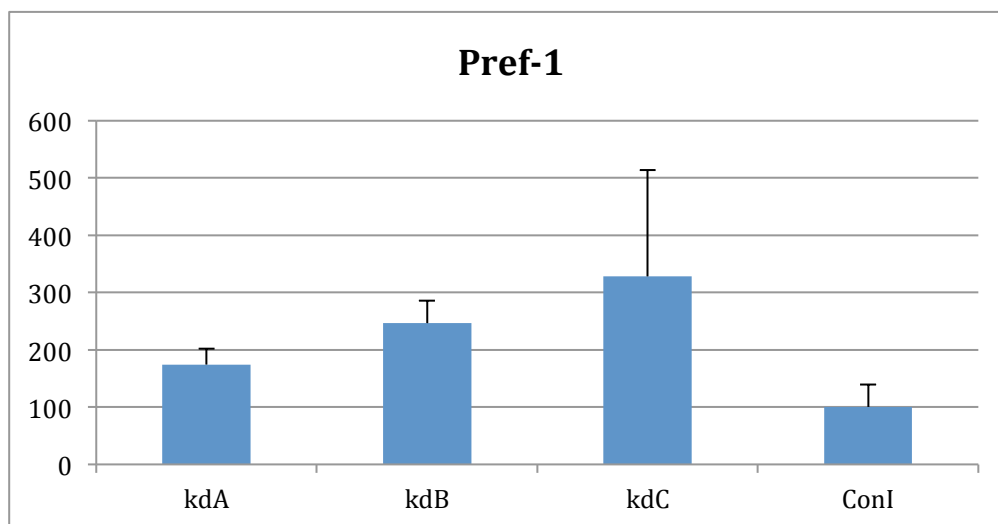
**Abb. 3.5: mRNA Expressionslevel des Differenzierungsmarkers PPAR $\gamma$  (Tag 9) in [%] von ConI, gemessen mit qRT-PCR, normiert auf 18S mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.**

Perilipin ist ein Oberflächenprotein, das Lipidtropfen umhüllt und einen Abbau der Fettsäuren durch das lipolytische Enzym HSL verhindert. Da die Menge des Proteins mit der Menge der Fettvesikel ansteigt, kann es als Maß für die Differenzierung herangezogen werden. Perilipin zeigte ebenfalls eine Tendenz zur geringeren Expression in den kd Linien (ConI 100 $\pm$ 31.0%, kdA 100.1 $\pm$ 13.2%, kB 82.4 $\pm$ 13.0%, kdC 73.4 $\pm$ 32.2%), jedoch wurde auch hier keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6:** mRNA Expressionslevel des Differenzierungsmarkers Perilipin (Tag 9) in [%] von ConI, gemessen mit qRT-PCR, normiert auf 18S mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.

Bei Pref-1 handelt es sich um ein *Epidermal Growth Factor-Like Repeat Protein*, welches nur auf Präadipozyten zu finden ist und im Laufe der Differenzierung nicht mehr exprimiert wird. Dieser Differenzierungsmarker zeigte sich in den kd Linien tendenziell höher als in den Kontrollen (ConI 100±39.2%, kdA 174.3±27.7%, kB 246.5±39.1%, kC 327.8±185.7%). Auch hier waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** mRNA Expressionslevel des Differenzierungsmarkers Pref-1 (Tag 9) in [%] von ConI, gemessen mit qRT-PCR, normiert auf 18S mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.

Zusammengenommen waren lediglich die Lipidmengen der kd Zellen als Folge der verminderten Mc2-R Expression reduziert. Die molekularen Differenzierungsmarker waren hingegen unbeeinflusst.



### 3.3 Mc2-R kd führt zu funktionellen Einschränkungen differenzierter 3T3-L1 Zellen

Lipolyse kann in Fettzellen auf unterschiedliche Arten induziert werden. Das Katecholamin Noradrenalin erreicht dies als direktes Sympathomimetikum über den  $\beta$ 1-Adrenozeptoren während ACTH hierfür den Mc2-R benötigt. Durch die Bindung an die jeweiligen Rezeptoren wird die Adenylatzyklase aktiviert und eine cAMP-Kaskade ausgelöst. In der Folge kommt es zur Freisetzung von Glycerin aus den Adipozyten.

Um funktionelle Konsequenzen des Mc2-R kd auf die Lipolyse zu untersuchen, wurden alle Zelllinien mit DPBS als Negativkontrolle (= 100 %), ACTH in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 nM bzw. 10 nM) und Noradrenalin (1  $\mu$ M) als Positivkontrolle stimuliert. Zur Quantifizierung der Lipolyserate wurde die freigesetzte Glycerinmenge im Überstand gemessen, auf die jeweilige Proteingesamtmenge normiert und verglichen; der Vergleich erfolgte zwischen Con I und den gepoolten Ergebnissen der *knockdown* Zellen.

In den Kontrollzellen steigerte Noradrenalin die Lipolyserate auf  $560 \pm 100$  %, während ACTH lediglich eine Steigerung auf  $174 \pm 22$  % bzw.  $231 \pm 29$  % bewirkte. In den kd Zelllinien betrug die ACTH vermittelten Lipolyse im Vergleich dazu nur  $108 \pm 9$  % ( $p=0.028$ ) bzw.  $147 \pm 8$  % ( $p=0.027$ ). Auch die Positivkontrolle mit Noradrenalin war in den kd Zelllinien mit  $155 \pm 26$  % und  $p=0.007$  signifikant verringert (Abb. 3.8).

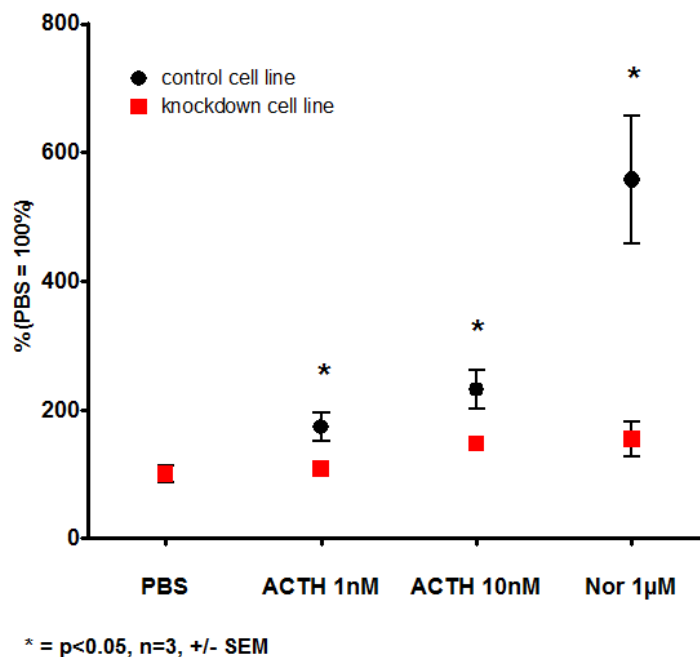
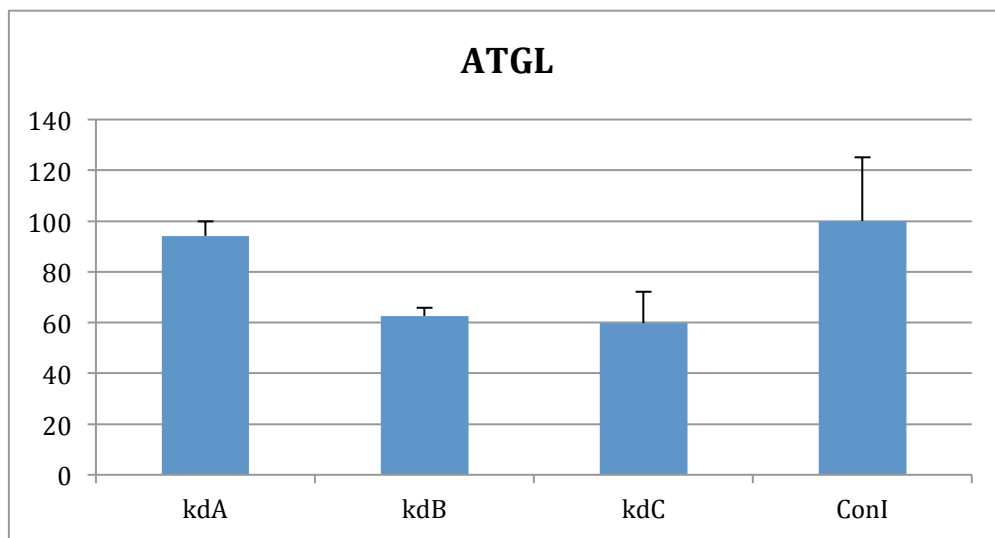
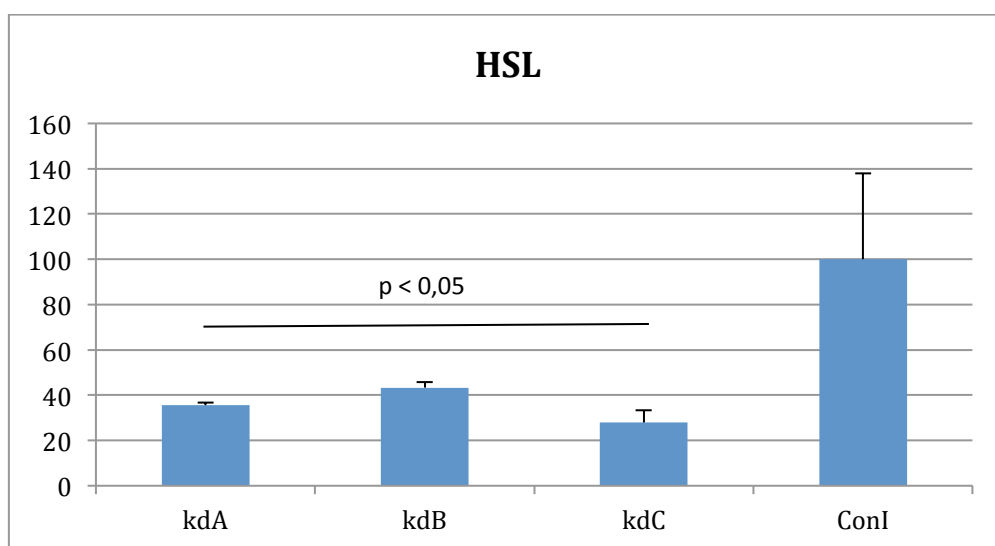


Abb. 3.8: Vergleich der Lipolyseraten anhand der freigesetzten Glycerinmenge nach Stimulation mit ACTH (1 und 10 nM) bzw. Noradrenalin (Nor, 1  $\mu$ M), in [%] der Negativkontrolle PBS, normiert auf die jeweilige Proteingesamtmenge. Angabe in mg Glycerin/ mg Protein/ 6 Stunden. Die Lipolyseraten der kd Zellen sind signifikant reduziert, sowohl bei Stimulation mit ACTH als auch mit Noradrenalin.

Diese signifikante Reduktion der Lipolyseraten warf die Frage nach dem beeinflussten Schritt der Lipolyse auf. Zum Abbau von Fettsäuren zu Di- und Monoglyceriden werden die lipolytischen Enzyme ATGL und HSL benötigt. Um den regelrechten Abbau der Fettsäuren in allen Zelllinien zu überprüfen, wurden im Anschluss die molekularen Expressionslevel dieser Enzyme analysiert. Beide zeigten sich in den kd Zelllinien vermindert. ATGL war mit 40 % (ConI 100±25.1%, kdA 94.2±5.8%, kB 62.6±3.1%, kdC 59.7±12.4%) nur tendenziell (Abb. 3.9), HSL dagegen mit 60 % (ConI 100±37.9%, kdA 35.6±1.2%, kB 43.4±2.4%, kdC 27.9±5.5%) signikant vermindert (Abb. 3.10).



**Abb. 3.9:** Vergleich der Expressionslevel des lipolytischen Enzyms ATGL in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.



**Abb. 3.10:** Vergleich der Expressionslevel des lipolytischen Enzyms HSL in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA. Die Expressionslevel in den kd Zelllinien zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion.

### 3.4 Mc2-R kd verändert die Fettsäurezusammensetzung qualitativ und quantitativ

Aufgrund der beobachteten Einschränkung des lipolytischen Potentials der Adipozyten durch den Mc2-R kd wurde im Folgenden ein möglicher Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus untersucht.

In die *De-novo*-Synthese, Verlängerung sowie Sättigung von Fettsäuren durch Einbau von Doppelbindungen ist eine Vielzahl von Enzymen involviert (Abb. 3.11).

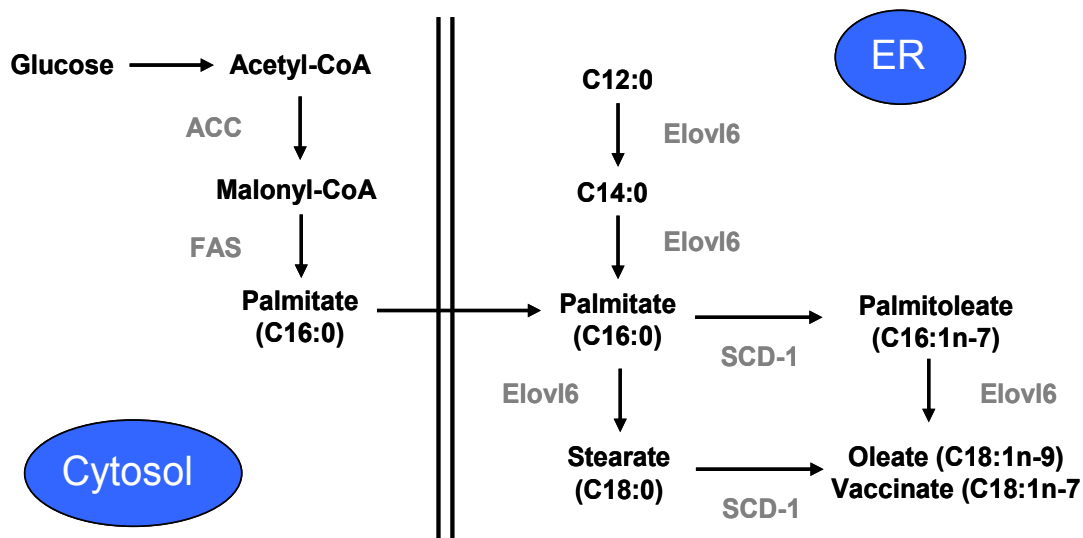
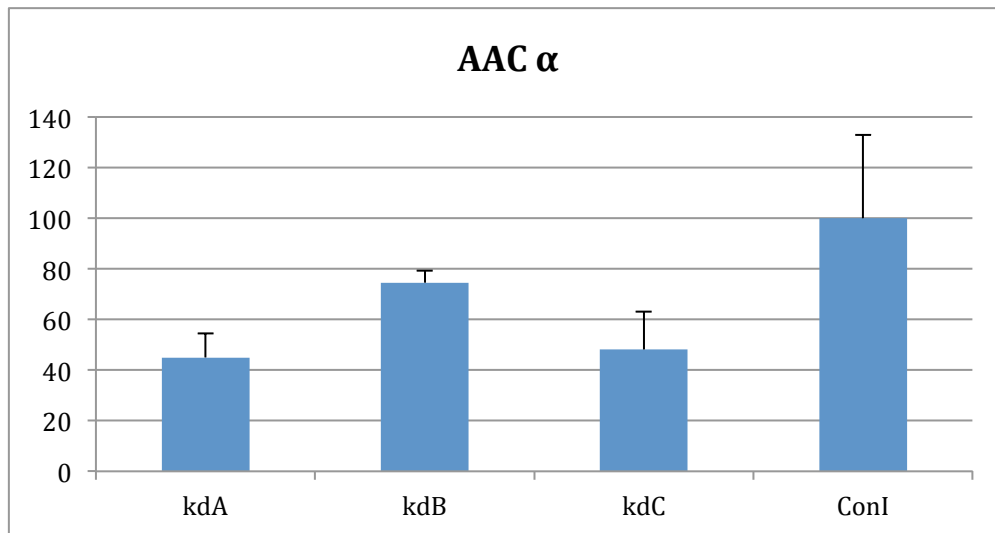


Abb. 3.11: Schema des Fettsäuremetabolismus

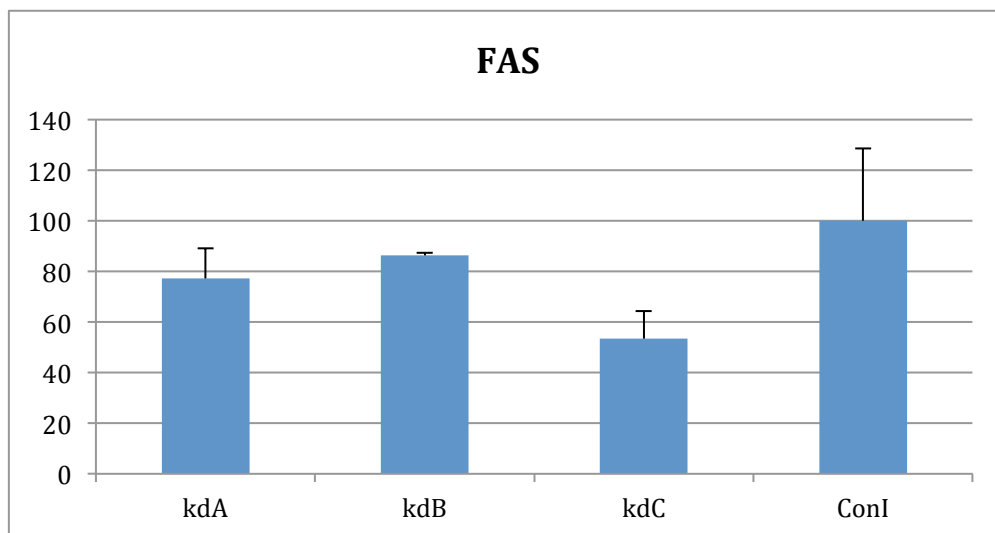
Bei der ausgiebigen Analyse der molekularen Expressionslevel dieser involvierten Enzyme zeigten nahezu alle eine Tendenz zur verminderten Expression in den Mc2-R kd Zelllinien. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mc2-R kd Zellen und den Kontrollen erreichten jedoch lediglich die Expressionslevel der *Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1* (SCD1).

Die *Acetyl Coenzyme A Carboxylase* (AAC)  $\alpha$  ist das erste relevante Enzym der *De-novo*-Synthese von Fettsäuren aus Glukose. Es katalysiert im Cytosol die Reaktion von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. Die kd Zelllinien zeigten einen Trend zu geringerer Expression ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Conl 100 $\pm$ 33.0%, kdA 45.0 $\pm$ 9.5%, kdB 74.5 $\pm$ 4.8%, kdC 48.2 $\pm$ 15.0%) (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers AAC  $\alpha$  in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.

Anschließend wird Malonyl-CoA in einer durch die *Fatty Acid Synthase* (FAS) katalysierten Reaktion zu Palmitat erweitert. Während der Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten steigen parallel sowohl die Syntheserate als auch die molekularen Expressionslevel der FAS bis auf das 17fache an (44). Die Unterschiede in unseren experimentellen Gruppen waren hingegen nicht signifikant (ConI 100 $\pm$ 28.5%, kdA 77.2 $\pm$ 11.9%, kB 86.2 $\pm$ 1.2%, kC 53.3 $\pm$ 11.0%) (Abb. 3.13).

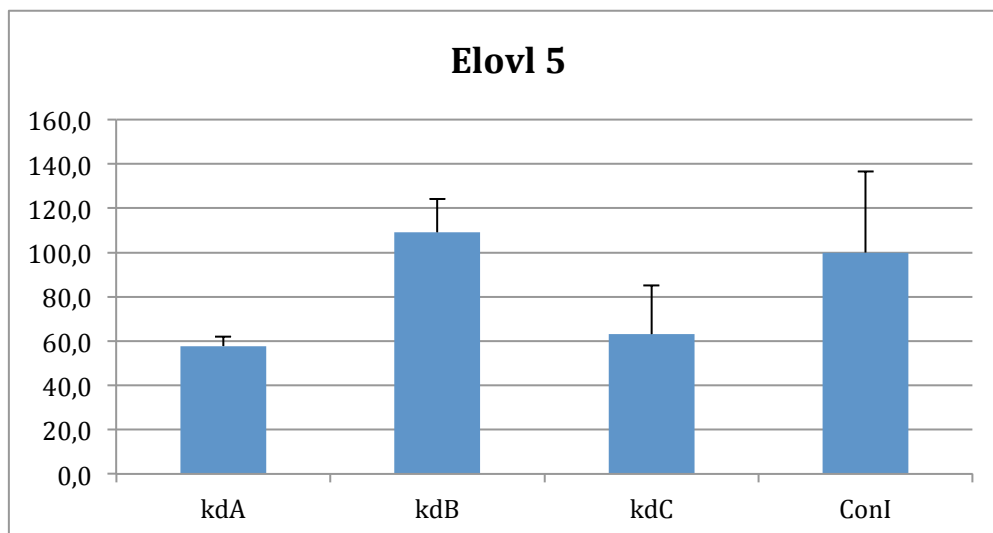


**Abb. 3.13:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers FAS in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.

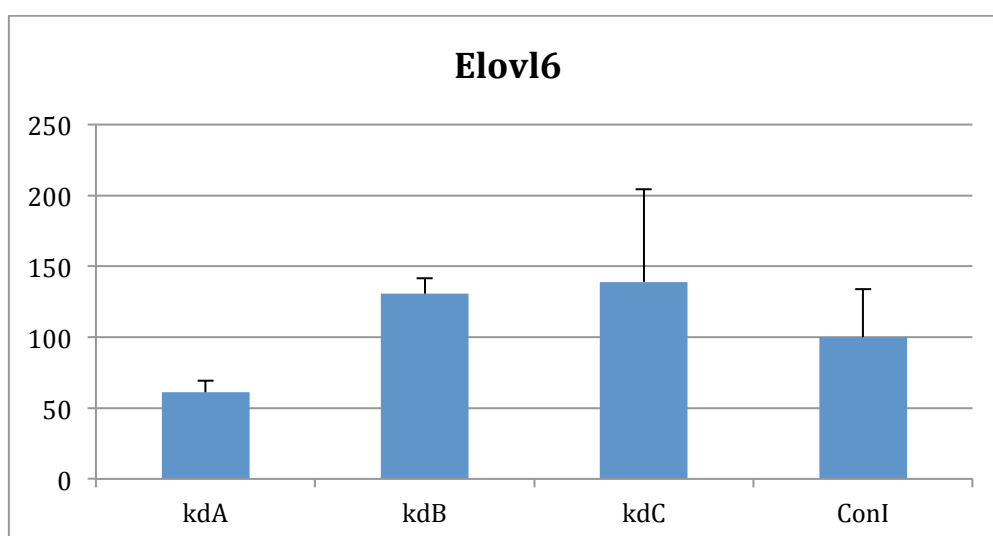
Zusätzlich zu dieser endogenen Synthese werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) mittel- und langkettige Fettsäuren ( $C_{12-16}$ ) durch die Enzyme *Elongation Of Long-Chain Fatty Acids*



(Elovl) 5 und 6 zu Palmitat verbunden. Daneben verlängert Elovl6 Palmitat zu Stearat sowie Palmitoleat zu Oleat und Vaccinat. Weder Elovl5 (Conl  $100 \pm 36.5\%$ , kdA  $57.8 \pm 4.3\%$ , kB  $109.1 \pm 15.1\%$ , kdC  $63.1 \pm 21.9\%$ ) (Abb. 3.14) noch Elovl6 (Conl  $100 \pm 33.7\%$ , kdA  $61.2 \pm 8.0\%$ , kB  $130.7 \pm 10.8\%$ , kdC  $139.1 \pm 65.2\%$ ) (Abb. 3.15) erreichten signifikante Unterschiede.

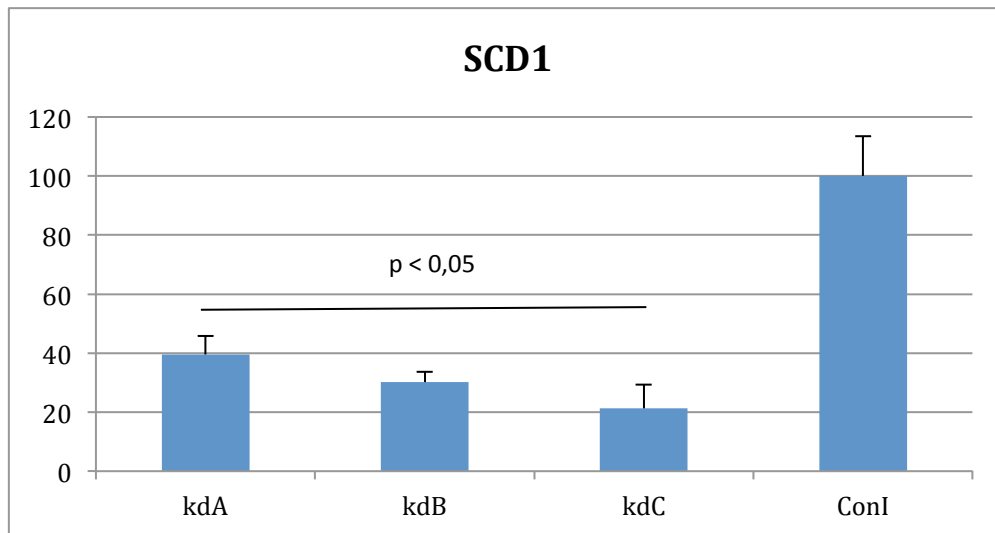


**Abb. 3.14:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers Elovl5 in [%] von Conl, normiert auf 18s mRNA.



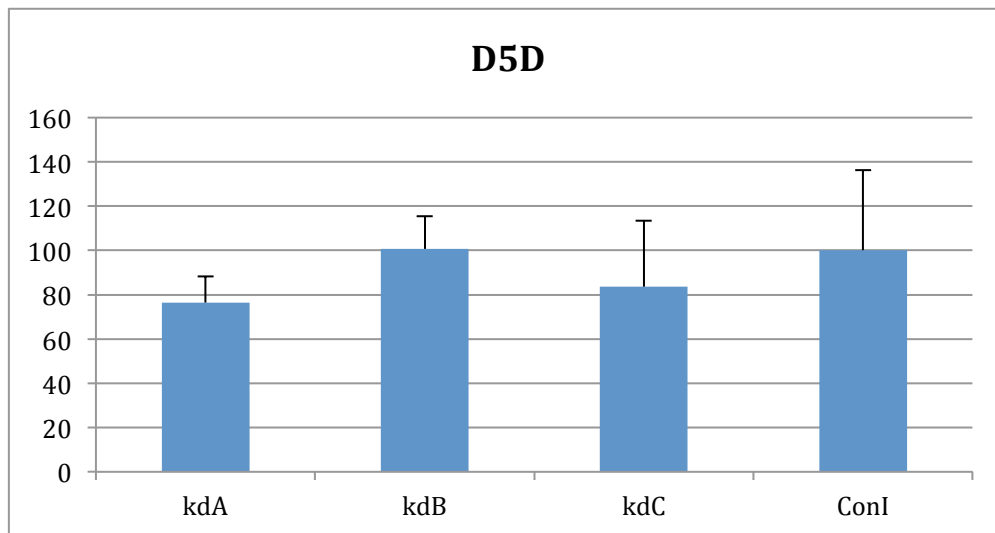
**Abb. 3.15:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers Elovl6 in [%] von Conl, normiert auf 18s mRNA.

Im Weiteren katalysiert SCD1 die Sättigung von Palmitat und Stearat zu Palmitoleat, Oleat und Vaccinat durch den Einbau von Doppelbindungen. Dieses Enzym war in den Mc2-R kd Linien signifikant vermindert exprimiert (Conl  $100 \pm 13.5\%$ , kdA  $39.5 \pm 6.2\%$ , kB  $30.1 \pm 3.6\%$ , kdC  $21.3 \pm 7.9\%$ ) (Abb. 3.16).

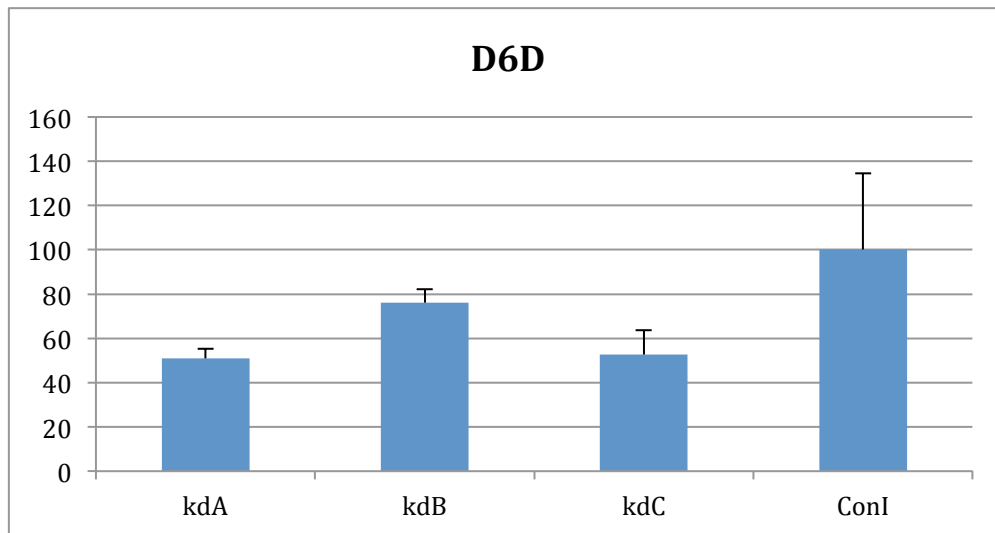


**Abb. 3.16:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers SCD1 in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA. Dieser zeigt sich in den kd Zelllinien signifikant gemindert (ConI 100±13.5%, kdA 39.5±6.2, kB 30.1±3.6%, kC 21.3±7.9%).

*Delta-5 Desaturase* (D5D) und *Delta-6 Desaturase* (D6D) sind Schlüsselenzyme bei der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie etwa Arachidonsäure (20:4n-6) und Docosahexaensäure (22:6n-3). Sie werden in Phospholipide eingebaut und sind von essentieller Bedeutung. Die erreichten Unterschiede waren weder bei D5D (ConI 100±36.3%, kdA 76.5±11.7, kB 100.7±14.7%, kC 83.6±29.8%) (Abb. 3.17) noch bei D6D (ConI 100±34.7%, kdA 51.0±4.2, kB 76.1±6.0%, kC 52.7±11.2%) (Abb. 3.18) statistische signifikant.

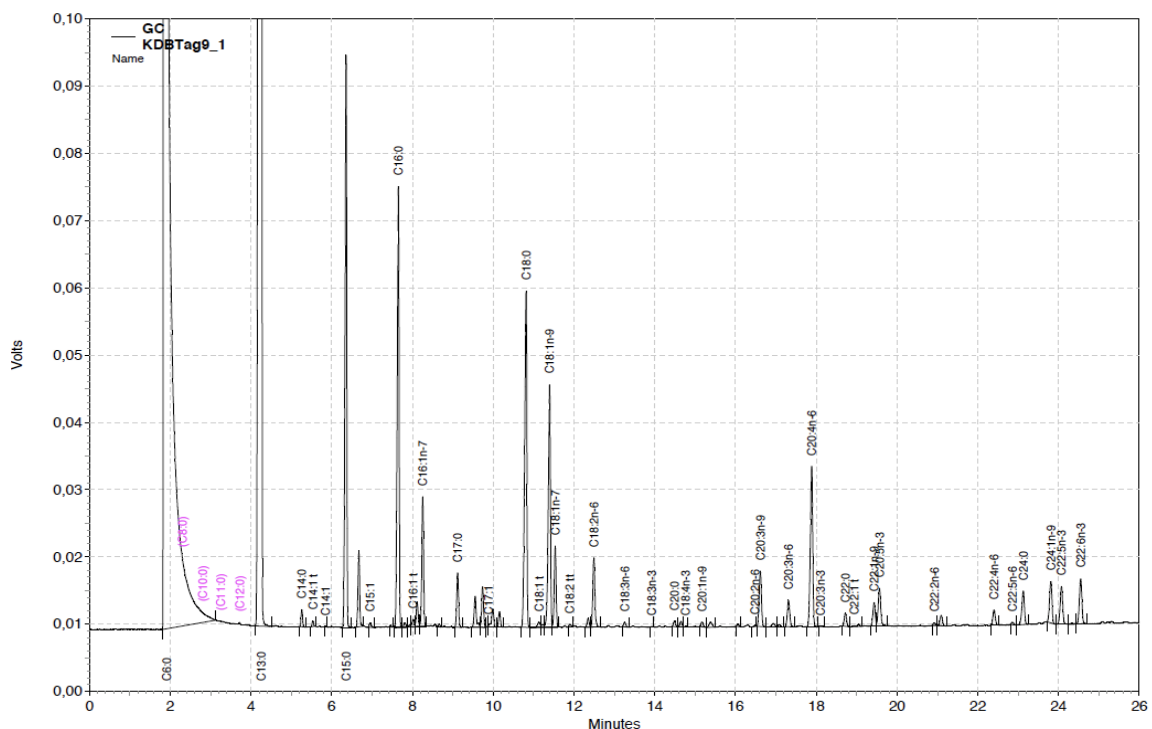


**Abb. 3.17:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers D5D in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA). Ein geringer Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.



**Abb. 3.18:** Vergleich der Expressionslevel des Fettsäuresynthesemarkers D6D in [%] von ConI, normiert auf 18s mRNA. Ein Trend zu geringerer Expression in den kd Zelllinien ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz.

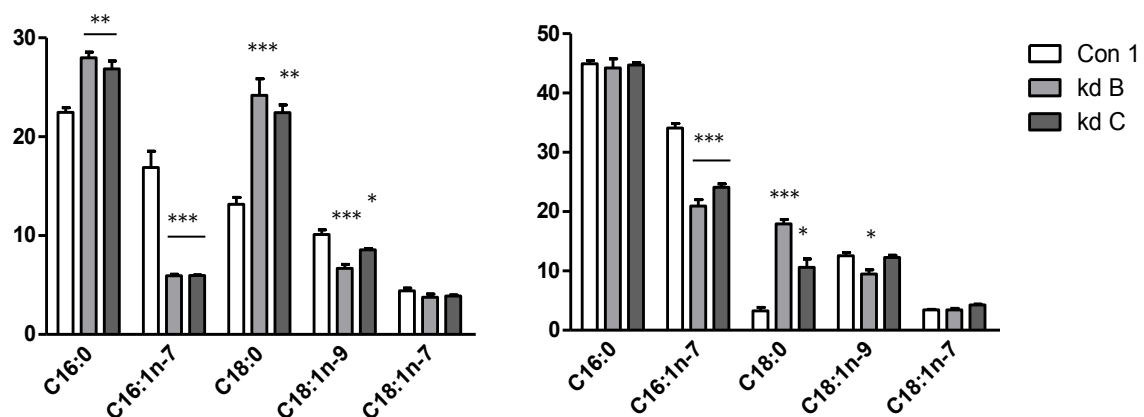
Die Minderung der SCD1 Expression bei sonst geringen Expressionsunterschieden ließ eine funktionelle Relevanz vermuten. Zur Erfassung qualitativer und quantitativer Unterschiede der Fettsäureprofile erfolgte anschließend deren Analyse. Hierfür wurden die Phospholipid- und Triglyceridfraktionen der differenzierten Adipozyten mittels Gaschromatographie untersucht (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Exemplarisches Chromatogramm einer Phospholipidanalyse; Austrittszeitpunkt und Substanzmenge der gemessenen Phospholipide werden als Peak detektiert und graphisch dargestellt.

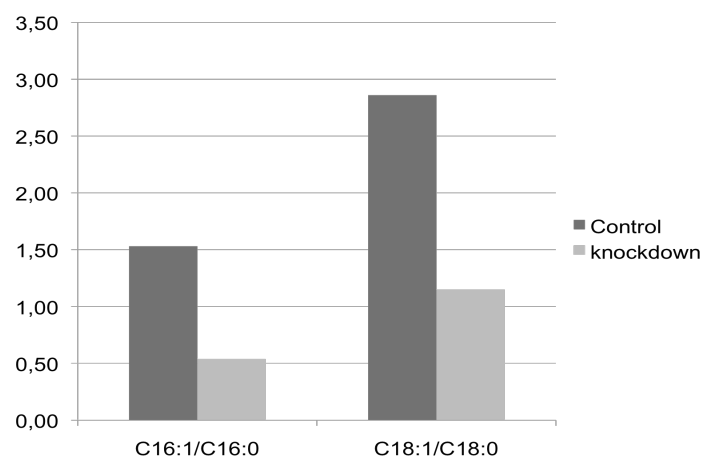
Da die Mindestzellanzahl zur gaschromatographischen Ermittlung zuverlässiger Werte 500.000 Zellen beträgt musste die Linie kd A bei ungenügender Menge an differenzierten Zellen ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die Fettsäureprofile der Mc2-R *knockdown* Zelllinien kd B und kd C in beiden Fraktionen eine Vermehrung der gesättigten Fettsäuren Palmitat (C16:0) und Stearat (C18:0) sowie eine Verminderung ihrer einfach ungesättigte Formen Palmitoleat (C16:1n-7), Vaccinat (C18:1n-7) und Oleat (C18:1n-9) (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20:** Vergleich der Fettsäureprofile in den Phospholipid- (links) und Triglycerid- (rechts) Fraktionen der verschiedenen Zelllinien, Analyse mittels Gaschromatographie, normiert auf internen Standard, Angabe in [%]. kd Linien zeigen in beiden Fraktionen Vermehrung der gesättigten Fettsäuren und Verminderung der einfach ungesättigten Formen. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

Das Verhältnis einfach ungesättigter zu gesättigter Fettsäuren, als „Desaturaseindex“ bezeichnet (45) und ein Massstab für die Aktivität der SCD1, war durch den *knockdown* substantiell verringert (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** Vergleich der Desaturaseindizes in den Phospholipidfraktionen der verschiedenen Zelllinien zeigt substantielle Verringerung in den kd Zelllinien.

---

Im Vergleich dazu zeigten sich die Verhältnisse der gesättigten Fettsäuren (C18:0/ C16:0) sowie ihrer ungesättigten Formen (C16:1n-7/ C18:1n-9) untereinander in allen Zelllinien vergleichbar. Dieses Verhältnis verdeutlicht die Aktivität der Elongase Elovl6, auf die der *knockdown* daher auch funktionell keinen Einfluss ausübte.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation konnte mit einem etablierten *in vitro* Modell eines stabilen Mc2-Rezeptor *knockdown* die funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors für Adipozytendifferenzierung, Lipolyse und Fettsäurezusammensetzung genauer beschrieben werden.

### ***Mc2-R kd hat eingeschränkte Lipidakkumulation zur Folge.***

Während Morphologie und genetisches Expressionsprofil der Differenzierungsmarker PPAR $\gamma$ , Perilipin und Pref-1 lediglich Trends aufwiesen, waren die Gesamtlipidmengen der muren Adipozyten durch den *knockdown* des Mc2-R signifikant erniedrigt. Dies stellte die funktionelle Relevanz des Mc2-R für die Lipidakkumulation der Adipozyten dar.

Bei der Etablierung des Modells wurden zwei Zelllinien wegen Hinweise auf „*off target effects*“ nicht weiter untersucht; in den drei verbliebenen kd Linien erreichte die Reduktion der Mc2-R Expression aber mindestens 60%, so dass die vorhandenen Unterschiede zwischen den Kontrollen und den kd Zelllinien als Wirkung der reduzierten Expression interpretierbar schienen. Der Zusatz von Puromycin in den Nährmedien sicherte die Eliminierung der Zellen ohne pSiren Vektor und verhinderte somit eine Verfälschung der Ergebnisse durch Zellen ohne den *knockdown*.

3T3-L1 Präadipozyten exprimieren den Mc2-R, der nahezu ausschliesslich durch ACTH aktiviert wird, erst während ihrer Differenzierung zu Adipozyten (31, 46). Folglich nimmt ACTH seinen Einfluss auf das Differenzierungspotential erst 2 Tage nach der Induktion. Zudem führt die Stimulation des Rezeptors auch zu einer Induktion der Promoteraktivität des Mc2-R Gens und damit zu einer weiteren Expressionssteigerung. Die maximale Stimulation des Mc2-R Promoters auf ACTH in Adipozyten erfolgt an Tag 4 (32). Dieser zeitliche Rahmen, dem eine *de novo* Proteinsynthese zugrunde liegt, wurde auch in einer früheren Studie an Nebennierenzellen veranschaulicht, in der ACTH Stimulation ebenso zur verstärkten Expression seines eigenen Rezeptors führte (47).

Auch andere Forschungsgruppen postulierten bereits die Existenz eines Regelkreislafs, bei dem ACTH die Expression seines eigenen Rezeptors beeinflusst (48-50). Erkenntnisse aus *ex vivo* Studien mit humanen Adipozyten deuteten darüber hinaus auf einen Melanokortinrezeptor-abhängigen Mechanismus zur Regulation von Adipozytenproliferation und -differenzierung über eine PPAR $\gamma$  abhängige Signaltransduktion hin (31, 46, 48). Umgekehrt zeigte sich eine Hemmung der Differenzierung und Adipogenese humaner und

muriner Präadipozyten durch das Vorhandensein von  $\alpha$ -MSH. Untersuchungen zum Einfluss von ACTH auf diese Vorgänge sind dagegen bisher wenig durchgeführt. PPAR $\gamma$  ist als essentieller, adipozytenspezifischer Transkriptionsfaktor bei der Differenzierung und Reifung von Adipozyten bereits gut bekannt (51-57). Als wechselseitige Beeinflussung wäre auch eine ACTH abhängige verstärkte Expression eines endogenen PPAR $\gamma$  Agonisten denkbar; in unserem *in vitro* Modell war dies aber nicht belegbar. Ob eine verminderte Stimulation aufgrund des Mc2-R kd zu einer relevant verminderten PPAR $\gamma$  Expression und somit zu dem beobachteten eingeschränkten Differenzierungspotential beiträgt, bleibt damit offen.

Die funktionelle Konsequenz ist eine verminderte Lipidakkumulation in den reifen Adipozyten. Den dargestellten Zusammenhang zwischen PPAR $\gamma$  Expressionsleveln und Lipidakkumulation veranschaulichten Tontonoz et al. 1994 auch in Nicht-Vorläufer Fibroblasten, die retroviral vermittelt PPAR $\gamma$  überexprimierten und in der Folge Merkmale maturer Adipozyten entwickelten; diese Forschungsgruppe postulierte, dass die Regulierung der Adipogenese vermittelt durch endogene Lipidaktivatoren eine der physiologischen Funktionen von PPAR $\gamma$  darstellt und knüpfte somit die Verbindung zwischen Adipozytendifferenzierung und systemischem Lipidmetabolismus (55). ACTH, vermittelt durch den Mc2-R, wäre ein denkbarer Aktivator.

Während in der vorliegenden Arbeit eine verringerte ACTH Stimulation die Lipidakkumulation der Präadipozyten reduzierte, demonstrierten Iwen et al. 2008 einen fehlenden Einfluss auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten durch eine dauerhafte ACTH Stimulation über 6 Tage, und zwar sowohl auf Lipidakkumulation als auch auf die Differenzierungsmarker PPAR $\gamma$  oder *Adipocyte Protein 2* (58). Somit scheint ACTH nach der Überschreitung eines Schwellenwertes keinen signifikanten Einfluss auf die regelrechte Adipozytendifferenzierung zu nehmen.

Zusammengenommen lässt sich hier ein beeinflussbarer Schritt während der Entwicklung von Adipozyten über den Mc2-R vermuten. Um eine Konsequenz für den klinischen Alltag ableiten zu können ist zunächst die Übertragbarkeit der Ergebnisse von dem verwendeten *in vitro* System auf die *in vivo* Situation zu prüfen. Daneben wären Versuche mit *knockout* Zellen von Interesse, um Reststimulationen verhindern und absolutere Aussagen treffen zu können. Zur Erörterung der möglichen Aktivierung eines endogenen PPAR $\gamma$  Agonisten durch ACTH wäre zudem die Zugabe eines PPAR $\gamma$  Agonisten wie Rosiglitazon von Interesse.

### ***Mc2-R kd führt zu funktionellen Einschränkungen differenzierter 3T3-L1 Zellen.***

Die vorliegenden Ergebnisse wiesen eine funktionelle Einschränkung der Adipozyten aufgrund des Mc2-R kd nach: Der *knockdown* führte einerseits zu einer verminderten Genexpression des lipolytischen Enzyms HSL, andererseits zu einer signifikanten Hemmung der lipolytischen Kapazität. Dieser Effekt war aber unerwarteterweise nicht nur in der ACTH-stimulierten Lipolyse vorhanden. Auch bei der Stimulation mit Noradrenalin zeigten sich signifikant verminderte Lipolyseraten in Mc2-R kd Zellen.

Die wichtigsten Aktivatoren der Lipolyse in Adipozyten sind Katecholamine, die über  $\beta$ -Adrenozeptoren ein Gs-Protein und so die Adenylatzyklase aktivieren (59). Auch Mc2-R ist an ein Gs-Protein gekoppelt. In der Folge erhöhen sich die intrazellulären cAMP Level, wodurch einerseits die *Protein Kinase A* (PKA) aktiviert, andererseits aber auch die Transkription über CREB beeinflusst wird (60, 61). CREB wiederum ist notwendig für die Adipogenese in murinen Fibroblasten, vermutlich durch Beeinflussung des Promotors des adipogenen Transkriptionsfaktors C/EBP- $\beta$  (62). C/EBP stimuliert im Zusammenspiel mit PPAR $\gamma$  das Adipozytenprogramm dramatisch.

2002 demonstrierten Jimenez et al. anhand von *triple  $\beta$ -Adrenoceptor knockout* Mäusen unerwartet hohe Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Fastens; die Insulinlevel, deren antilipolytischer Effekt bekannt ist, waren dabei unbeeinflusst (63). Dies zeigte bereits, dass neben den Katecholaminen weitere lipolytische Hormone mit einem signifikanten Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus existieren mussten. Der substantielle Anstieg der Lipolyse durch Aktivierung des Mc2-R mittels ACTH wurde bereits *in vivo* und *ex vivo* nachgewiesen (35, 61, 64). In neuesten Studien wurde daneben eine bedeutende Funktion des zentralen Melanokortinsystems für Substratverteilung und Fettmobilisation beschrieben, die eine enge Interaktion mit der Lipolyse belegen (65). Aktuellste Studien beschreiben Mc2-R und Mc5-R mit ihren Liganden ACTH und  $\alpha$ -MSH als wichtige Mediatoren bei der Regulation des Adipozytenmetabolismus und Freisetzung freier Fettsäuren sowohl in 3T3-L1 Zellen als auch in primären Adipozyten (66). Darüberhinaus wurde in adipösen Patienten ein Rückkopplungsmechanismus freier Fettsäuren auf den Hypothalamus nachgewiesen: durch pharmakologische Hemmung der Lipolyse konnten nicht nur die erhöhten Spiegel freier Fettsäuren gesenkt werden, auch die pathologisch gesteigerte ACTH Sekretion normalisierte sich in der Folge (67). Dass dieser Zusammenhang bei schlanken Personen nicht nachweisbar war (68) lässt indirekt auf die Bedeutung des Mc2-R für die Pathophysiologie der Adipositas schließen.

Die Verfügbarkeit freier Fettsäuren wird vornehmlich von der Lipasen-abhängigen Hydrolyse der Triacylglyceride aus Fettdepots bestimmt (20). Die Lipasen ATGL und HSL sind hierfür von



vorherrschender Relevanz, da sie etwa 95% dieses Vorgangs vermitteln; die kürzlich entdeckte ATGL katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden ersten Schritt der Hydrolyse von Triacylglyceriden zu Diacylglyceriden und freien Fettsäuren spezifisch und nahezu vollständig und scheint im Vergleich zur HSL die funktionell wichtigere Lipase zu sein (35, 69). HSL übernimmt die anschließende Hydrolyse zu Monoglyceriden und freien Fettsäuren und ist hierbei geschwindigkeitsbestimmend (70). Während die Aktivierung der HSL durch Phosphorylierung via PKA gut beschrieben ist, sind die Regulationsmechanismen von ATGL seit der Entdeckung dieser Lipase 2004 Gegenstand intensiver Forschung. Wie kürzlich gezeigt wurde, erfolgt die Phosphorylierung und somit Aktivierung durch die *AMP-Activated Protein Kinase* an dem Protein  $\alpha/\beta$ -Fold Domain-Containing Protein 5 (ABHD5; auch *Comparative Gene Identification-58* (CGI-58)) (71). Kim et al. zeigten 2006 darüber hinaus, dass die murine ATGL eine Promotorregion als Transkriptionsziel für PPAR $\gamma$  besitzt (72). Andererseits erkannte die Forschungsgruppe um Hämmerle erst kürzlich, dass bei der Lipolyse von Triglyceriden durch ATGL essentielle Mediatoren entstehen, die an der Erzeugung von Lipidliganden zur Aktivierung von PPAR beteiligt sind (73). Hier lässt sich ein aktiver Regelkreislauf mit gegenseitiger Beeinflussung von PPAR $\gamma$  und ATGL zur Steuerung der Lipolyse vermuten. Diesen Zusammenhang demonstrierten auch Rodriguez-Cuenca et al. in einer aktuellen Studie anhand eines Mausmodells, bei dem das dysfunktionale PPAR $\gamma$  zur Reduktion der Katecholamin-induzierten Lipolyse sowie zu verminderter Expression der Lipasen ATGL und HSL führte; diese Forschungsgruppe postulierte eine PPAR $\gamma$ -abhängige Aktivierung eines lipolytischen Regelkreislaufes durch Beeinflussung katalytischer und regulatorischer Untereinheiten der PKA (74).

In der vorliegenden Arbeit führte der Mc2-R kd zu einer signifikanten Reduktion der HSL sowie zu einer tendentiellen Reduktion der ATGL. ATGL Mangel wurde bereits in Mäusen und Menschen mit signifikant verminderten Lipolyseraten, vermehrter Fettablagerung und daraus folgender Organverfettung assoziiert (10, 74-76). Auch in dieser Arbeit waren die Lipase-abhängigen Lipolyseraten signifikant vermindert, und zwar unabhängig von der stimulierenden Substanz, also ACTH oder Noradrenalin. Die Ursache ist hier in der reduzierten ATGL zu vermuten da bereits früher deutlich gezeigt wurde, dass ein Mangel an HSL nur moderat verminderte Lipolyseraten zur Folge hat (70, 77); diese Vermutung ließ sich jedoch in unserem *in vitro* Modell nicht nachweisen.

Da ATGL eine Promoterregion für PPAR $\gamma$  besitzt, wäre auch eine verminderte Expression dieses Proteins als Ursache der verminderten Lipolyseraten denkbar. Andererseits wird durch die Lipolyse über ATGL PPAR $\gamma$  aktiviert, so dass auch ein ATGL Mangel zur Verminderung von PPAR $\gamma$  führen könnte; wissenschaftliche Belege zu diesen theoretischen Modellen konnten mit

dieser Studie jedoch nicht erfolgen. Um bei diesen Gedankenansätzen Ursache und Wirkung zu differenzieren würde sich eine Studie mit den Mc2-R kd Zellen unter gleichzeitiger Überexpression von ATGL anbieten; zu untersuchen wäre bei diesem Modell, ob die artifiziell erhöhten ATGL Level neben einer zu erwartenden Erhöhung der Lipolyseraten auch zu erhöhten PPAR $\gamma$  Leveln führen.

Die verminderten Lipolyseraten aufgrund des Mc2-R kd demonstrierten erneut eine enge Interaktion zwischen Lipidmetabolismus und dem zentralen Melanokortinsystem. Da auch die Noradrenalin stimulierten Lipolyseraten durch den *knockdown* signifikant vermindert waren, scheint ACTH neben der bereits bekannten direkten Stimulation der Lipolyse über Mc2-R auch durch Beeinflussung der involvierten Lipasen einen signifikanten Einfluss auf die regelrechte Lipolysefunktion der Adipozyten zu nehmen. Dies könnte etwa über den dargestellten aktiven Regelkreislauf zwischen PPAR $\gamma$  und ATGL erfolgen.

#### ***Mc2-R kd verändert die Fettsäurezusammensetzung qualitativ und quantitativ.***

Gaschromatographische Vergleiche der Phospholipid- und Triglyceridfraktionen demonstrierten quantitative und qualitative Unterschiede der Fettsäureprofile zwischen den Kontrollen und den kd Zelllinien. Das Verhältnis gesättigter zu ungesättigter Fettsäuren spiegelte bereits die verminderte Aktivität der SCD1 in den kd Linien wider und bestätigte sich in der qRT-PCR durch signifikant erniedrigte SCD1-Genexpression.

SCD1, eines der zentralen Enzyme der Lipogenese und geschwindigkeitsbestimmend bei der Bildung einfach ungesättigter Fettsäuren, war in den kd Linien signifikant vermindert. Die anderen Enzyme des Fettsäuremetabolismus waren nur tendentiell erniedrigt. Der Zusammenhang zwischen pathologischen Veränderungen im Rahmen von Adipositas und dem SCD1 abhängigen Einfluss auf den Lipidmetabolismus wurde immer wieder postuliert und erforscht. Cohen et al. veranschaulichten an *ob/ob* Mäusen, dass sich die hypometabolischen Phänotypen durch einen SCD1 Mangel normalisierten (78). Die Forschungsgruppe um Ntambi demonstrierte anhand von SCD1 *knockout* Mäusen, dass diese Deletion zu verminderter Triglyceridsynthese und -speicherung, erhöhter metabolischer Rate, verstärkter Insulinempfindlichkeit und Resistenz gegenüber ernährungsbedingter Adipositas führt (79). Diese Gruppe vermutete den beeinflussten Schritt zwischen der unveränderten PPAR Transkription und SCD1. Smith et al. postulierten als Grund für die erhöhten Raten an FAS und SCD1 in ihren Studien, dass diese Enzyme transkriptionale Ziele von PPAR $\gamma$  darstellten (31). Für beide Gedankenansätze kommt ACTH via Mc2-R als Aktivator endogener Agonisten bzw. als Ligandenlieferant in Frage.

Die Rolle von SCD1 in der Energiehomöostase ist darüber hinaus auch im wechselseitigen Einfluss mit Leptin und ACTH beschrieben. SCD1 ist ein Zielgen der Leptinsignaltransduktion (78, 80), seine Expression wird durch Leptin unterdrückt. Die Aktivierung von Mc2-R durch ACTH und der folgende substantielle Anstieg der Lipolyserate wiederum führen zu Verminderung der Leptinproduktion und -sekretion (37). Die verminderte Lipolyserate aufgrund des *knockdown* führte daher vermutlich zu vermehrter Leptinproduktion und folglich verminderter SCD1 Expression; aufgrund der reduzierten Desaturaseaktivität veränderte sich das Fettsäureprofil in den kd Zellen mit Verminderung der einfach ungesättigten Formen Palmitoleat (C16:1n-7) und Oleat (C18:1n-9) sowie einer Vermehrung der gesättigten Fettsäuren Palmitat (C16:0) und Stearat (C18:0). Das Fettsäureprofil der SCD1 *knockout* Mäuse in der Studie von Ntambi et al. veränderte sich dementsprechend (79). Der hierdurch verminderte „Desaturaseindex“ (Palmitoleat:Palmitat sowie Oleat:Stearat) (45) und die quantitativen Veränderungen in spezifischen Fettsäuren wurden bereits *in vivo* mit Insulinresistenz assoziiert und als möglicherweise ursächlich in der Pathogenese erwogen (20, 61). Gerade der einfach ungesättigten Fettsäure Palmitoleat wurde in der Vergangenheit bei der Entstehung von Insulinresistenz und dem Vorgang der ‚Lipotoxizität‘ eine mögliche Schlüsselfunktion zugeschrieben; hohe Serumspiegel führten im Mausmodell zu verbesserter Insulinsensitivität von Muskelzellen und verminderter Leberverfettung (20, 21, 31).

Daneben wurden verminderte Oleatlevel erst kürzlich mit dem modulierenden Einfluss von SCD1 auf Entzündungsprozesse assoziiert (81). Auch Iwen et al. demonstrierten 2008 eine induzierbare Insulinresistenz durch eine Dauerstimulation mit ACTH; in der Folge war die Glukoseaufnahme vermindert, die differenzierten murinen Adipozyten zeigten ein proinflammatorisches Adipozytokinprofil (58). Jun et al wiesen 2010 darüber hinaus nach, dass eine Expressions- und Sekretionssteigerung des Entzündungsmediators IL6 in 3T3-L1 Adipozyten über Melanokortinrezeptoren vermittelt wird. Diese erfolgte über  $\alpha$ -MSH an MC5R sowie über ACTH an Mc2-R; bemerkenswerterweise fanden diese beobachteten Effekte bei Konzentrationen der Mediatoren statt, die in Adipozyten Lipolyse induzieren sowie Leptinexpression inhibieren (82).

Das qualitativ und quantitativ veränderte Fettsäureprofil der kd Zellen legte die Rolle des Mc2-R als Bindeglied zwischen zentralem Melanokortinsystem und der Lipogenese nahe. Aus dem Einfluss auf SCD1 als eines der zentralen Enzyme der Biosynthese von Fettsäuren lässt sich die wichtige Bedeutung des Mc2-R auf die regelrechte Fettsäurezusammensetzung folgern. Um die dargestellten, bislang als vorläufig einzustufenden Zusammenhänge weiter zu erforschen sind Versuchsreihen mit höheren n-Zahlen notwendig. Zur Verifizierung des postulierten Regelkreises sollten dabei auch die korrelierenden Expressionslevel von Leptin in einem *in vivo*

System berücksichtigt werden. Sollte sich der gezeigte Zusammenhang als reproduzierbar bestätigen, könnten sich hier neben therapeutischen Ansätzen auch neue Möglichkeiten für Forschung und Diagnostik ergeben; Fettsäureprofile von Adipozyten könnten etwa als frühe Marker für Insulinresistenz und das metabolische Syndrom Anwendung finden.

Die Funktion des Mc2-R auf Adipozyten ist bisher wenig verstanden, seine Rolle in Energiehomoöstatik und Lipidmetabolismus ist Gegenstand intensiver Forschung. Ein Zusammenhang zwischen dem zentralen Melanokortinsystem und den pathologischen Veränderungen im Rahmen von Adipositas, Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom wurden immer wieder postuliert und untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die Bedeutung des Rezeptors für regelrechte Lipidakkumulation, lipolytisches Potential, funktionelle Integrität sowie Quantität und Qualität der Fettsäurezusammensetzung in 3T3-L1 Adipozyten dar. Die Erkenntnisse reißen sich in die neusten Beschreibungen des Melanokortinsystem in seiner bedeutenden Funktion für Substratverteilung, Fettmobilisation und Energiehomoöstatik ein. Die ausgeprägten Effekte des Mc2-R kd lassen zusammengefasst auf neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten in das durch massive Begleit- und Folgeerscheinungen geprägte Krankheitsbild der Adipositas hoffen. Durch Reduktion der Lipolyse in Adipozyten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität verbessern zu können, wurde bereits vermutet (10). Erstrebenswert wäre hier ein frühzeitiger, präventiver Einfluss auf die Entwicklung der Insulinresistenz durch Verhinderung ungünstiger Fettsäureprofile, spezifischer Fettsäuren sowie der unkontrollierten Freisetzung und Ablagerung von veränderten Fettsäuren an unphysiologischen Stellen des Körpers durch Alteration des Mc2-R. Daneben birgt die Steuerung von Lipolyse und Freisetzung freier Fettsäuren die Möglichkeit zur Steigerung des Lipidmetabolismus.

Natürlich sind diese potentiellen therapeutischen Ansätze kritisch zu bewerten, da Adipositas und die daraus resultierenden metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen ursächlich zumeist auf einen ungünstigen Lebensstil zurückzuführen sind. Präventive Aufklärung und Schulung müssen daher stets an erster Stelle stehen. Dennoch ist der Wert der Aufklärung pathophysiologischer Grundlagen und Interventionsmöglichkeiten eines interdisziplinär so stark vertretenen Krankheitsbildes nicht hoch genug einzuschätzen.

## 5 Zusammenfassung

Das Melanokortinsystem hat essentielle Bedeutung für die zentrale und periphere Regulation der Energiehomöostase. Die Expression des Melanokortin-2-Rezeptors (Mc2-R, ACTH-Rezeptor), dessen einziger Ligand das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) ist, wurde auf Adipozyten nachgewiesen. Sein signifikanter Anstieg während der Differenzierung sowie die durch ihn vermittelte Aktivierung der Lipolyse sind gut beschrieben. Die Sekretion von ACTH ist bei Adipositas erhöht und durch freie Fettsäuren beeinflusst. Bislang ist über seine physiologische bzw. pathologische Funktion und Relevanz wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des ACTH-Rezeptors in Adipozyten genauer zu untersuchen und Auswirkungen auf Differenzierung, Fettspeicherung, Fettsäurezusammensetzung und Lipolyse zu ermitteln.

Hierfür wurde ein *in vitro* Modell mit stabilem *knockdown* des Mc2-R in 3T3-L1 Präadipozyten etabliert. Durch dauerhafte Expression von *short hairpin* RNA wurde eine Suppression des Rezeptors in differenzierten Adipozyten um mindestens 60 % erreicht. Die Auswirkungen wurden hinsichtlich Morphologie, Genexpression, lipolytischem Potential und Fettsäureprofil mit Kontrollzellen ohne *knockdown* verglichen.

Die Morphologie im nativen und gefärbten mikroskopischen Vergleich schien unverändert, die molekularen Differenzierungsmarker waren lediglich tendenziell erniedrigt (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$*  und Perilipin) bzw. erhöht (*Preadipocyte Factor 1*). Die Lipidmenge der *knockdown* Zellen hingegen war signifikant erniedrigt und wies somit das eingeschränkte Potential der Adipozyten zur Lipidakkumulation aufgrund der verminderten Mc2-R Expression nach.

Nach Stimulation mit ACTH bzw. Noradrenalin wurde die Lipolyse analysiert. Erstaunlicherweise war bei reduzierter Expression des Mc2-R auch die durch Noradrenalin vermittelte Lipolyse signifikant erniedrigt. Dies ging mit einer verminderten Genexpression des lipolytischen Enzyms *Hormone Sensitive Lipase* einher und zeigte die funktionelle Relevanz des Mc2-R auf das gesamte lipolytische Potential der Adipozyten.

Gaschromatographische Vergleiche der Phospholipid- und Triglyceridfraktionen demonstrierten veränderte Fettsäureprofile in den Mc2-R *knockdown* Linien. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sie eine Vermehrung der gesättigten Fettsäuren Palmitat (C16:0) und Stearat (C18:0) sowie eine Verminderung ihrer einfach ungesättigten Formen Palmitoleat (C16:1n-7), Oleat (C18:1n-7) und Vaccinat (C18:n-9). Hierdurch waren die Verhältnisse von einfach ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren (C16:1/ C16:0 und C18:1/ C18:0) in den *knockdown*

---

Linien signifikant verändert. Dieser Desaturaseindex spiegelte bereits die verminderte Aktivität der *Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1* in den *knockdown* Zellen wider und bestätigte sich in der quantitativen Real-Time PCR durch signifikant erniedrigte Genexpression. Andere Enzyme des Fettsäuremetabolismus wie *Acetyl Coenzyme A Carboxylase  $\alpha$* , *Fatty Acid Synthase*, *Elongation of Long-Chain Fatty Acids 5*, *Elongation of Long-Chain Fatty Acids 6*, *Delta-5 Desaturase* und *Delta-6 Desaturase* zeigten sich lediglich tendentiell erniedrigt.

Zusammengenommen bestätigte sich die wichtige Bedeutung des ACTH-Rezeptors für Energiehomöostase und Lipidmetabolismus in 3T3-L1 Adipozyten. Der Rezeptor scheint einen maßgeblichen Einfluss auf regelrechte Lipidakkumulation, lipolytisches Potential, funktionelle Integrität sowie Quantität und Qualität der Fettsäurezusammensetzung in Adipozyten zu nehmen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. <Die Herausforderung Adipositas und Strategien zu ihrer Bekämpfung in der Europäischen Region der WHO.pdf>.
2. 2008 <Nationale\_Verzehrsstudie\_II\_Ergebnisbericht\_Teil\_1.pdf>.
3. **Virtue S, Vidal-Puig A** 2008 It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS biology* 6:e237
4. **Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ** 2003 Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* 348:1625-1638
5. **Slawik M, Beuschlein F** 2006 [Genetics and pathophysiology of obesity]. *Der Internist* 47:120-129
6. **Nicholls DG, Locke RM** 1984 Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological reviews* 64:1-64
7. **Lonnqvist F, Krief S, Strosberg AD, Nyberg S, Emorine LJ, Arner P** 1993 Evidence for a functional beta 3-adrenoceptor in man. *British journal of pharmacology* 110:929-936
8. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B** 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293:E444-452
9. **Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P** 2008 Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787
10. **Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R** 2006 Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312:734-737
11. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
12. **Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW** 2005 Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346
13. **Fernandez-Real JM, Ricart W** 2003 Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine reviews* 24:278-301
14. **Bell GI, Polonsky KS** 2001 Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414:788-791
15. **Kahn BB, Flier JS** 2000 Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 106:473-481
16. **Arner P, Bernard S, Salehpour M, Possnert G, Liebl J, Steier P, Buchholz BA, Eriksson M, Arner E, Hauner H, Skurk T, Ryden M, Frayn KN, Spalding KL** 2011 Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* 478:110-113
17. **Slawik M, Vidal-Puig AJ** 2006 Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing research reviews* 5:144-164
18. **Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A** 2007 PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS genetics* 3:e64

19. **Sethi JK, Vidal-Puig AJ** 2007 Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of lipid research* 48:1253-1262
20. **Cao H, Gerhold K, Mayers J, Wiest M, Watkins S, Hotamisligil G** 2008 Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell* 134:933-944
21. **Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N, Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hasty AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H, Osuga J-i, Yamada N** 2007 Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 13:1193-1202
22. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** 1998 Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews* 78:783-809
23. **Altiock S, Xu M, Spiegelman BM** 1997 PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes & development* 11:1987-1998
24. **Selvarajan S, Lund LR, Takeuchi T, Craik CS, Werb Z** 2001 A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nature cell biology* 3:267-275
25. **Guo X, Liao K** 2000 Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 251:45-53
26. **Rosen ED, MacDougald OA** 2006 Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:885-896
27. **Tontonoz P, Spiegelman BM** 2008 Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry* 77:289-312
28. **Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ** 2011 Adipogenesis at a glance. *Journal of cell science* 124:2681-2686
29. **Voisey J, Carroll L, van Daal A** 2003 Melanocortins and their receptors and antagonists. *Current drug targets* 4:586-597
30. **Boston BA** 1999 The role of melanocortins in adipocyte function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 885:75-84
31. **Smith SR, Gawronska-Kozak B, Janderová L, Nguyen T, Murrell A, Stephens JM, Mynatt RL** 2003 Agouti Expression in Human Adipose Tissue. *Diabetes* 52:2914-2922
32. **Noon LA** 2004 A Peroxisome Proliferator-response Element in the Murine mc2-r Promoter Regulates Its Transcriptional Activation during Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279:22803-22808
33. **Noon LA, Bakmanidis A, Clark AJ, O'Shaughnessy PJ, King PJ** 2006 Identification of a novel melanocortin 2 receptor splice variant in murine adipocytes: implications for post-transcriptional control of expression during adipogenesis. *Journal of molecular endocrinology* 37:415-420
34. **Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U** 2006 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1083:111-128
35. **Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R, Zimmermann R** 2006 Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase Are the Major Enzymes in Adipose Tissue Triacylglycerol Catabolism. *Journal of Biological Chemistry* 281:40236-40241



- 
36. **Renz M, Tomlinson E, Hultgren B, Levin N, Gu Q, Shimkets RA, Lewin DA, Stewart TA** 2000 Quantitative expression analysis of genes regulated by both obesity and leptin reveals a regulatory loop between leptin and pituitary-derived ACTH. *The Journal of Biological Chemistry* 275:10429-10436
  37. **Norman, D.** 2003 ACTH and  $\alpha$ -MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 200:99-109
  38. **Spinedi E, Gaillard RC** 1998 A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. *Endocrinology* 139:4016-4020
  39. **Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R** 2005 Lipolysis: pathway under construction. *Current opinion in lipidology* 16:333-340
  40. **Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH** 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226:497-509
  41. **Carnielli VP, Pederzini F, Vittorangeli R, Luijendijk IH, Boomaars WE, Pedrotti D, Sauer PJ** 1996 Plasma and red blood cell fatty acid of very low birth weight infants fed exclusively with expressed preterm human milk. *Pediatric research* 39:671-679
  42. **Klingler M, Demmelmair H, Koletzko B, Glaser C** 2011 Fatty acid status determination by cheek cell sampling combined with methanol-based ultrasound extraction of glycerophospholipids. *Lipids* 46:981-990
  43. **Chui PC, Guan H-P, Lehrke M, Lazar MA** 2005 PPAR $\gamma$  regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *Journal of Clinical Investigation* 115:2244-2256
  44. **Paulauskis JD, Sul HS** 1988 Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 263:7049-7054
  45. **Ntambi JM, Miyazaki M** 2004 Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in lipid research* 43:91-104
  46. **Boston BA, Cone RD** 1996 Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 137:2043-2050
  47. **Penhoat A, Jaillard C, Saez JM** 1989 Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:4978-4981
  48. **Motta M, Mangili G, Martini L** 1965 A "short" feedback loop in the control of ACTH secretion. *Endocrinology* 77:392-395
  49. **Morita TM, Imai T, Murata Y, Kambe F, Funahashi H, Takagi H, Seo H** 1995 Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) increases the expression of its own receptor gene. *Endocrine journal* 42:475-480
  50. **Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD** 1994 ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 99:R17-20
  51. **Hamm JK, el Jack AK, Pilch PF, Farmer SR** 1999 Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Annals of the New York Academy of Sciences* 892:134-145
  52. **Morrison RF, Farmer SR** 1999 Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry Suppl* 32-33:59-67

53. **Morrison RF, Farmer SR** 1999 Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 274:17088-17097
54. **Spiegelman BM** 1997 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *European journal of medical research* 2:457-464
55. **Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM** 1994 Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156
56. **Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM** 1995 Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Current opinion in genetics & development* 5:571-576
57. **Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM** 1999 Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular cell* 3:151-158
58. **Iwen KAH, Senyaman O, Schwartz A, Drenckhan M, Meier B, Hadaschik D, Klein J** 2008 Melanocortin crosstalk with adipose functions: ACTH directly induces insulin resistance, promotes a pro-inflammatory adipokine profile and stimulates UCP-1 in adipocytes. *Journal of Endocrinology* 196:465-472
59. **Lafontan M, Barbe P, Galitzky J, Tavernier G, Langin D, Carpene C, Bousquet-Melou A, Berlan M** 1997 Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Human reproduction* 12 Suppl 1:6-20
60. **Holm C** 2003 Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society transactions* 31:1120-1124
61. **White JE, Engel FL** 1958 Lipolytic action of corticotropin on rat adipose tissue in vitro. *The Journal of clinical investigation* 37:1556-1563
62. **Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD** 2004 Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 279:4471-4478
63. **Jimenez M, Leger B, Canola K, Lehr L, Arboit P, Seydoux J, Russell AP, Giacobino JP, Muzzin P, Preitner F** 2002 Beta(1)/beta(2)/beta(3)-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *FEBS letters* 530:37-40
64. **Kelly KL, Wong EH, Jarett L** 1985 Adrenocorticotrophic stimulation and insulin inhibition of adipocyte phospholipid methylation. *The Journal of Biological Chemistry* 260:3640-3644
65. **Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, Pfluger PT, Castaneda TR, Neschen S, Hofmann SM, Howles PN, Morgan DA, Benoit SC, Szanto I, Schrott B, Schurmann A, Joost HG, Hammond C, Hui DY, Woods SC, Rahmouni K, Butler AA, Farooqi IS, O'Rahilly S, Rohner-Jeanrenaud F, Tschop MH** 2007 The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *The Journal of clinical investigation* 117:3475-3488
66. **Moller CL, Raun K, Jacobsen ML, Pedersen TA, Holst B, Conde-Frieboes KW, Wulff BS** 2011 Characterization of murine melanocortin receptors mediating adipocyte lipolysis and examination of signalling pathways involved. *Molecular and Cellular Endocrinology* 341:9-17
67. **Kok P, Kok SW, Buijs MM, Westenberg JJ, Roelfsema F, Frolich M, Stokkel MP, Meinders AE, Pijl H** 2004 Enhanced circadian ACTH release in obese premenopausal

- women: reversal by short-term acipimox treatment. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287:E848-856
68. **Lanfranco F, Giordano R, Pellegrino M, Gianotti L, Ramunni J, Picu A, Baldi M, Ghigo E, Arvat E** 2004 Free fatty acids exert an inhibitory effect on adrenocorticotropin and cortisol secretion in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:1385-1390
  69. **Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R** 2004 Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386
  70. **Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R** 2002 Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *The Journal of Biological Chemistry* 277:4806-4815
  71. **Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CS, Kim Y, Bruss M, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Wang Y, Duncan RE, Kang C, Sul HS** 2011 Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism* 13:739-748
  72. **Kim JY, Tillison K, Lee JH, Rearick DA, Smas CM** 2006 The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 291:E115-127
  73. **Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, Buttner S, Schmidt A, van de Weijer T, Hesselink M, Jaeger D, Kienesberger PC, Zierler K, Schreiber R, Eichmann T, Kolb D, Kotzbeck P, Schweiger M, Kumari M, Eder S, Schoiswohl G, Wongsiriroj N, Pollak NM, Radner FP, Preiss-Landl K, Kolbe T, Rulicke T, Pieske B, Trauner M, Lass A, Zimmermann R, Hoefler G, Cinti S, Kershaw EE, Schrauwen P, Madeo F, Mayer B, Zechner R** 2011 ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nature Medicine* 17:1076-1085
  74. **Rodriguez-Cuenca S, Carobbio S, Velagapudi VR, Barbarroja N, Moreno-Navarrete JM, Tinahones FJ, Fernandez-Real JM, Oresic M, Vidal-Puig A** 2012 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility. *Molecular and cellular biology* 32:1555-1565
  75. **Fischer J, Lefevre C, Morava E, Mussini JM, Laforet P, Negre-Salvayre A, Lathrop M, Salvayre R** 2007 The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nature genetics* 39:28-30
  76. **Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R** 2009 Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 297:E289-296
  77. **Okazaki H, Osuga J, Tamura Y, Yahagi N, Tomita S, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Kimura S, Gotoda T, Shimano H, Yamada N, Ishibashi S** 2002 Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 51:3368-3375
  78. **Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM** 2002 Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297:240-243
  79. **Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzierski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD** 2002 Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects

- 
- mice against adiposity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:11482-11486
80. **Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM** 2000 Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes & development* 14:963-980
81. **Liu X, Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Zhao M, Chu K, Paton CM, Joo DS, Ntambi JM** 2010 Loss of Stearoyl-CoA desaturase-1 attenuates adipocyte inflammation: effects of adipocyte-derived oleate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30:31-38
82. **Jun DJ, Na KY, Kim W, Kwak D, Kwon EJ, Yoon JH, Yea K, Lee H, Kim J, Suh PG, Ryu SH, Kim KT** 2010 Melanocortins induce interleukin 6 gene expression and secretion through melanocortin receptors 2 and 5 in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of molecular endocrinology* 44:225-236

---

## 7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AAC	Acetyl Coenzyme A Carboxylase
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
BAT	Brown Adipose Tissue
BMI	Body Mass Index
BHT	Butylhydroxytoluol
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
cDNA	complementary DNA
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
Ct	cycle threshold
D5D	Delta-5 Desaturase
D6D	Delta-6 Desaturase
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Elovl	Elongation of Long-Chain Fatty Acids
FAS	Fatty Acid Synthase
FBS	Foetal Bovine Serum
fwd	forward
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis
HSL	Hormone Sensitive Lipase
kbp	kilo base pairs
kd	knockdown
LPL	Lipoprotein Lipase
Mc2-R	Melanokortin-2-Rezeptor, ACTH-Rezeptor

---

mRNA	messenger RNA
MSH	Melanocyte-Stimulating Hormone
NCS	Newborn Calf Serum
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protein Kinase A
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$
Pref-1	Preadipocyte Factor 1
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
rev	reverse
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCD1	Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1
shRNA	short hairpin RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Martin Reincke möchte ich für die Möglichkeit danken, die vorliegende Dissertation an der Medizinischen Klinik IV der LMU München zu erstellen.

Mein herzlicher Dank für die hervorragende Betreuung, freundliche Unterstützung und stetige Förderung meiner Arbeit gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Felix Beuschlein. Vielen Dank für die vielen wertvollen Ratschläge und das mühevollen und rasche Korrekturlesen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Marc Slawik. Mit unendlich viel Geduld, Kompetenz und Einfühlungsvermögen vermittelte er mir die Grundlagen der experimentellen Forschung, förderte meine Selbstständigkeit im wissenschaftlichen Arbeiten und brachte mir die nötige Frustrationstoleranz bei.

Herrn Dr. med. Matthias Betz danke ich sehr für die tolle Zusammenarbeit. Seine freundliche, engagierte und unermüdliche Hilfe bei Planung, Durchführung und Auswertung trug wesentlich zum Gelingen und Beenden meiner Arbeit bei.

Vielen Dank an meine lieben Laborkollegen für die freundschaftliche und bisweilen sehr amüsante Arbeitsatmosphäre, wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Brigitte Mauracher für die ausgezeichnete Einarbeitung in das Laborleben, ihre tatkräftige wie herzliche Unterstützung und den freundschaftlichen Beistand – Vielen Dank, Brigitte!!

Auch der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. B. Koletzko, insbesondere Frau Monika Rachl und Herr Dr. med. Hans Demmelmeier, möchte ich für die freundliche Aufnahme, Einarbeitung und gemeinsame Arbeit im Fettstoffwechsellabor danken.

Unendlicher Dank gebührt meinen Eltern, deren grenzen- und bedingungslose Unterstützung mir Studium und Promotion erst ermöglicht haben.

Meinen wundervollen Freunden danke ich von Herzen für ihr uneingeschränktes Vertrauen, endloses Verständnis und den immerwährenden Rückhalt.

## 9 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. **Hatiboglu N**, Betz MJ, Hadaschick D, Mauracher B, Rachl M, Demmelmair J, Koletzko B, Slawik M, Beuschlein F  
Mc2 receptor in adipocytes is significant for lipid composition and regular lipolysis  
*European Congress of Endocrinology 2009*  
*Istanbul, Türkei*
2. **Hatiboglu N**, Mauracher B, Demmelmair J, Koletzko B, Betz MJ, Slawik M, Beuschlein F  
Funktion des ACTH Rezeptors in Fettzellen  
*DoktaMed 2009*  
*München, Deutschland*
3. **Hatiboglu N**, Slawik M, Beuschlein F  
Erforschung von Grundlagen der Fettsucht  
*Jahrestagung der Deutsch-Türkischen Medizinergesellschaft 2012*  
*Nürnberg, Deutschland*

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit veröffentlicht:

1. **Betz\* MJ, Hatiboglu\* N, Mauracher B, Hadaschik D, Sauter A, Demmelmair H, Koletzko B, Beuschlein\* F, Slawik\* M** 2012 Mc2 receptor knockdown modulates differentiation and lipid composition in adipocytes. *Hormone and metabolic research* 44:670-675